



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

**EVALUACIÓN DE LA LETALIDAD MICROBIANA
MEDIANTE TRATAMIENTOS UVC EN CONTINUO Y SU
COMBINACIÓN CON UHPH EN MATRICES LÍQUIDAS
DE pH NEUTRO**

Maria Martínez Garcia

Tesis Doctoral

Bellaterra, noviembre de 2019





Universitat Autònoma de Barcelona

**EVALUACIÓN DE LA LETALIDAD MICROBIANA
MEDIANTE TRATAMIENTOS UVC EN CONTINUO Y SU
COMBINACIÓN CON UHPH EN MATRICES LÍQUIDAS
DE pH NEUTRO**

Tesis Doctoral

Memoria presentada al *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*

Para optar al grado de doctor en **Ciencia de los Alimentos**

Doctoranda: Maria Martínez Garcia

Directora

Director

Director y tutor

M^a Manuela Hernández
Herrero

Ramón Gervilla Fernández
Servei Planta de Tecnologia
dels Aliments (SPTA), de la
Universitat Autònoma de
Barcelona

Artur Xavier Roig Sagués
Departament de Ciència
Animal i dels Aliments de
la Universitat Autònoma
de Barcelona

Departament de Ciència
Animal i dels Aliments
de la Universitat
Autònoma de Barcelona

Bellaterra, noviembre de 2019.

A tots i a totes que heu fet possible que hagi pogut arribar fins aquí.

Es fa difícil poder agrair tots aquests anys de convivència amb tots vosaltres perquè no tindria espai per poder fer justícia a tot el que ha suposat compartir-ho tots junts.

Primer als meus directors, que he estat tant afortunada de poder tenir tres, a vosaltres Artur, Manoli i Ramón per la vostra paciència, coneixement i comprensió que m'heu brindat durant tots aquests anys. Gràcies per ajudar-me a créixer com a persona al vostre costat.

Belén, gràcies per ser la primera en confiar en mi quan encara no havia acabat la carrera. Em vas introduir en aquest apassionant món de la investigació. Estaré sempre molt agraïda de tot el que vas fer per mi en aquells anys i has continuat fent fins avui dia.

Dolors, gràcies per acollir-me al teu laboratori amb tanta bondat i gràcies per recolzar-me en tot moment, fins hi tot quan vaig començar i no sabia ni preparar medis de cultiu...

Carol, no hi ha paraules que puguin expressar tot el que ha suposat compartir aquests anys, sense tu no estaria aquí escrivint això. Em sento tant afortunada de tenir-te al meu costat que només vull dir-te, gràcies per ser-hi i si us plau, continua sent-hi molts anys més.

Jezer, a mi compañero de proyecto, de despacho y de tesis. Gracias por tu infinito conocimiento, por tu paciencia, por tus consejos... Gracias por estar siempre cuando he necesitado de tu ayuda.

Anne-So, gracias por tu temple y saber estar, per a mi has estat una font d'admiració. Gràcies per demostrar-me que si ho treballes tot es possible, de gran vull ser com tu.

Joan Miquel, gràcies per acollir-me a sa planta pilot i ajudar-me sempre en tot el que he necessitat. Ah! També gràcies per ampliar el meu vocabulari de paraules menorquines. Alberto gracias a ti también por tu acogida, por tus charlas y por personalizarme las llaves del pàrquing.

Carme i Andrea per ajudar-me a una part d'aquesta tesi amb el seu treball de final de màster. Gràcies per compartir aquesta feina amb mi.

Marta i Josep, moltes gràcies per ser els meus #jefazos del workshop i per donar-me aquesta meravellosa oportunitat de formar del vostre equip. Gràcies de tot cor.

A totes les persones que m'han ajudat i recolzat amb la meva etapa docent a la universitat; Vicky, Bibi, Toni, Jordi, Manuel, Montse Vila, Pepe, Artur, Manoli, Carol, Teresa... Gràcies a vosaltres he pogut descobrir una nova part de mi.

Gràcies a les meves dues estimades Sónies, Llorenç i Genuina, Idoia, Alicia, Arnau i Vicenç per fer-me els dies més fàcils amb els vostres somriures i alegria.

Gràcies, pa i ma pel vostre suport constant, generositat i paciència infinita que encara que estigüeu a distància m'heu hagut d'aguantar. Gràcies a tu també Lluís per conviure amb mi i cuidar-me durant aquesta etapa. Iaia i avi, gràcies per la vostra gran generositat i estima durant tots aquests anys d'estudis, amb vosaltres es pa i sa ma casi no els he trobat a faltar. No podria estar més agraïda de poder tenir aquesta família.

David, Miu i Tora, família que he escollit, gràcies per ajudar-me, comprendre'm i estimar-me constantment. Us prometo que a partir d'ara us faré més cas.

Resumen

En este trabajo se estudian las características intrínsecas de un reactor de ultravioleta de onda corta (UVC; Patente n° 2 965 766 B2) y como éstas influyen en cuatro matrices alimentarias líquidas de pH neutro con diferentes coeficientes de absorción (254 nm). Las matrices testadas en este trabajo han sido las siguientes: leche entera, leche desnatada, licuado de soja y té verde. Las matrices fueron inoculadas con esporas de *Bacillus subtilis* y otros microorganismos según tratamiento y matriz. Además, se ensayó la combinación de los tratamientos de UVC con tratamientos de UHPH o diferentes rangos de temperaturas (4, 20 y 55 °C) del reactor UVC para poder evaluar el posible efecto sinérgico, aditivo o complementario del uso de las dos tecnologías (UHPH-UVC) de procesado.

Los tratamientos se contrastaron frente a esporas de *B. subtilis* que fueron inoculadas en leche entera, leche desnatada, licuado de soja y té verde hasta asegurar una concentración inicial de entre 5,5 y 6,0 log UFC/mL. Una vez inoculadas, las matrices se sometieron a radiación UVC con 3 tipos de tratamientos UVC (T1, T2 y T3) basados en la velocidad del paso de la matriz por el reactor, en un rango de dosis de 10 a 160 J/mL. Los tratamientos T1 mostraron, en general, un bajo nivel de eficacia. Los mejores resultados se reportaron con el tratamiento T3 a una dosis de 160 J/mL, donde en todos los casos la letalidad de las esporas de *B. subtilis* fue igual o superior de 5 log, aunque se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el té verde y las otras 3 matrices testadas.

Las conidiosporas de *Aspergillus niger* fueron inoculadas en té verde y licuado de soja. En este caso, se reportó como el microorganismo más resistente de todos los testados donde ni con el tratamiento T3 a la máxima dosis (160 J/mL) se llegaron a reducir 5 log UFC/mL. No obstante, a igualdad de dosis, para el tratamiento T1 no se consiguió llegar a 1 log de reducción en el licuado de soja.

Con respecto a las células vegetativas, *Escherichia coli* fue inoculada en licuado de soja y té verde mostrando una mayor sensibilidad a los tratamientos por UVC que los microorganismos esporulados, ya que con 120 J/mL se alcanzaron los 5 log UFC/mL de reducción con el tratamiento T3. En el caso de inocular *E. coli* en té verde, se alcanzó el mismo nivel de reducción pero con solo aplicar 10 J/mL con el tratamiento T3, además las diferencias entre los tratamientos T1 y T2 no fueron tan evidentes. También se inoculó *Listeria monocytogenes* en licuado de soja y té verde, en este caso mostró la mayor sensibilidad de todos los microorganismos testados, ya que con en el licuado de

soja sólo se necesitaron 80 J/mL para conseguir una reducción de 5 log UFC/mL con el tratamiento T3. Aún así con el tratamiento T1 no se consiguió llegar a 1 log UFC/mL de reducción ni con la dosis más elevada (160 J/mL). Cuando se inoculó *L. monocytogenes* en té verde se observaron posibles efectos antilisterianos presentes de manera natural en el té verde.

De esta manera, debido a las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos T1, T2 y T3, a pesar de utilizar la misma dosis UVC, se ha intentado describir un fenómeno aplicable a las matrices con un coeficiente de absorción (254 nm) elevado, a partir del cual a igualdad de dosis aplicada se consigan valores de letalidad más elevados al aumentar el número de pases o valor NET.

Cuando se utilizó el equipo UHPH para tratar las conidiosporas de *A. niger* con 200 MPa a 20 °C y a 60 °C inoculadas en licuado de soja, se consiguió una reducción logarítmica total de este microorganismo. Para las esporas de *B. subtilis* inoculadas en licuado de soja a diferentes presiones (100 – 200 MPa) y a diferentes temperaturas (20 – 60 °C) no se mostraron reducciones significativas y lo mismo ocurrió cuando se inocularon las mismas esporas en leche entera y desnatada y se trató a 200 MPa a 60 °C. Al combinar tratamientos UHPH y UVC tanto para las conidiosporas de *A. niger* inoculadas en licuado de soja como las esporas de *B. subtilis* inoculadas en licuado de soja, leche entera y leche desnatada, no se observó efecto sinérgico y en el caso de la leche desnatada, se reportaron letalidades menores al tratar *a posteriori* con radiación UVC. Solo en el caso de tratar primero el licuado de soja y la leche entera con UHPH a 200 MPa y 60 °C y seguidamente tratar las muestras en el reactor UVC con los tratamientos T2 y T3, se observó un ligero efecto aditivo entre los tratamientos combinados.

Cuando se combinó la temperatura (4, 20 y 55 °C) durante los tratamientos UVC realizados con té verde inoculado con esporas de *B. subtilis* no se observó ningún efecto sinérgico o aditivo en la letalidad del microorganismo.

Resum

En aquest treball s'estudien les característiques intrínseques del un reactor d'ultravioleta de ona curta (UVC; Patent nº 2 965 766 B2) i com aquestes influeixen en les diferents matrius alimentàries líquides de pH neutre amb diferents coeficients d'absorció (254 nm). Les matrius testades en aquest treball han estat les següents: llet sencera, llet desnatada, lliquat de soja i te verd inoculades amb espores de *Bacillus subtilis* i altres microorganismes segons tractament i matriu. A més, es combinen els tractaments de UVC amb tractaments d'UHPH o diferents rangs de temperatures (4, 20 i 55 ° C) del reactor UVC per poder avaluar el possible efecte sinèrgic, additiu o complementari de l'ús de dues tecnologies (UHPH-UVC) de processat.

Les espores de *B. subtilis* van ser inoculades en llet sencera, llet desnatada, lliquat de soja i te verd fins assegurar una concentració inicial d'entre 5,5 i 6,0 UFC/mL log per després sotmetre-les a radiació UVC amb 3 tipus de tractaments (T1, T2 i T3) en un rang de dosis de 10 a 160 J/mL. Els millors resultats es van reportar amb el tractament T3 a una dosi de 160 J/mL on en tots els casos la letalitat de les espores de *B. subtilis* va ser igual o superior de 5 log UFC/mL, tot i que es van reportar diferències significatives ($p < 0,05$) entre el te verd i les altres 3 matrius testades.

Les conidiospores d'*Aspergillus niger* van ser inoculades en te verd i lliquat de soja. En aquest cas, es va reportar com el microorganisme més resistent de tots els testats on ni amb el tractament T3 a la màxima dosi (160 J/ml) es van arribar a reduir 5 log UFC/mL, tot i que a igualtat de dosi, per al tractament T1 no va aconseguir arribar a 1 log de reducció en el lliquat de soja.

Pel que fa a les cèl·lules vegetatives, *Escherichia coli* va ser inoculada en lliquat de soja i te verd on va mostrar una major sensibilitat als tractaments per UVC que els microorganismes esporulats, ja que amb 120 J/mL es va arribar als 5 log UFC/mL de reducció amb el tractament T3. En el cas d'inocular *E. coli* a te verd, es va assolir el mateix nivell de reducció però amb només aplicar 10 J/mL amb el tractament T3 i les diferències entre els tractaments T1 i T2 no van ser tan evidents. També es va inocular *L. monocytogenes* en lliquat de soja i te verd, en aquest cas va mostrar la major sensibilitat de tots els microorganismes testats ja que amb al lliquat de soja només es van necessitar 80 J/mL per aconseguir una reducció de 5 log UFC/mL amb el tractament T3

tot i que amb el tractament T1 no es va aconseguir arribar a 1 log UFC/mL de reducció ni amb la dosi més elevada (160 J/mL). Quan es va inocular *Listeria monocytogenes* en te verd es van observar possibles efectes antilistèrians presents de manera natural en el te verd.

D'aquesta manera, a causa de les diferències significatives ($p < 0,05$) entre els tractaments T1, T2 i T3 tot i utilitzar la mateixa dosi UVC, s'ha intentat descriure un fenomen aplicable a les matrius amb un coeficient d'absorció (254 nm) elevat, a partir del qual a igualtat de dosi aplicada s'aconsegueixin valors de letalitat més elevats en augmentar el nombre de passos o valor NET.

Quan es va utilitzar l'equip UHPH per tractar les conidiospores d'*A niger* amb 200 MPa a 20 °C i a 60 °C inoculades en líquat de soja, es va aconseguir una reducció logarítmica total d'aquest microorganisme. Per a les espores de *B. subtilis* inoculades en líquat de soja a diferents pressions (100-200 MPa) i a diferents temperatures (20-60 °C) no es van mostrar reduccions significatives i el mateix va passar quan es van inocular les mateixes espores en llet sencera i desnatada i es va tractar a 200 MPa a 60 °C.

En combinar tractaments UHPH i UVC tant per a les conidiospores d'*A niger* inoculades en líquat de soja com les espores de *B. subtilis* inoculades en líquat de soja, llet sencera i llet desnatada, no es va observar efecte sinèrgic i en el cas de la llet desnatada, es van reportar letalitats menors en tractar *a posteriori* amb radiació UVC. Només en el cas de tractar primer el líquat de soja i la llet sencera amb UHPH a 200 MPa i 60°C i seguidament tractar les mostres al reactor UVC amb els tractaments T2 i T3, es va observar un lleuger efecte additiu entre els tractaments combinats.

Quan es va combinar la temperatura (4, 20 i 55 ° C) durant els tractaments UVC realitzats amb te verd inoculat amb espores de *B. subtilis* no es va observar cap efecte sinèrgic o additiu en la letalitat del microorganisme.

Abstract

In this project, the characteristics of the shortwave ultraviolet reactor (UVC: Patent n° 2 965 766 B2) were studied and how these influence the different liquid food matrices of neutral pH with different absorption coefficients (254 nm). The matrices tested in this thesis have been the following: whole milk, skimmed milk, soymilk and green tea inoculated with spores of *Bacillus subtilis* and other microorganisms according to treatment and matrix. In addition, UVC treatments were combined with UHPH treatments or different temperature ranges (4, 20 and 55°C) of the UVC reactor to evaluate the possible synergic, additive or complementary effect of the use of two technologies (UHPH-UVC).

The spores of *B. subtilis* were inoculated in whole milk, skimmed milk, soymilk and green tea until an initial concentration of between 5.5 and 6.0 log CFU/mL was confirmed. Then they were subjected to UVC radiation with 3 types of treatments (T1, T2 and T3) in a dose range of 10 to 160 J/mL. The best results were reported with the T3 treatment at a dose of 160 J/mL where in all cases the lethality of *B. subtilis* spores was equal to or greater than 5 log CFU/mL, although significant differences were reported ($p < 0.05$) between green tea and the other 3 tested matrices.

The conidiospores of *Aspergillus niger* were inoculated in green tea and soymilk. In this case, it was reported as the most resistant microorganism of all the tested ones where even with the T3 treatment at the maximum dose (160 J/mL) they were reduced to 5 log CFU/mL. When an equal dose was used with the T1 treatment it did not reach 1 log of reduction in soymilk.

In relation to vegetative cells, *Escherichia coli* was inoculated in soymilk and green tea where it showed a greater sensitivity to UVC treatments than sporulated microorganisms, since with 120 J/mL the 5 log reduction was achieved with the T3 treatment. In the case of inoculating *E. coli* in green tea, the same level of reduction was reached but with only applying 10 J/mL with the T3 treatment, the differences between the treatments T1 and T2 were not so evident either. *Listeria monocytogenes* was also inoculated in soymilk and green tea, in this case it showed the highest sensitivity of all the microorganisms tested; only 80 J/mL was needed in the soymilk to achieve a 5 log CFU/mL reduction with the T3 treatment, even though with the T1 treatment it was not possible to reach 1 log CFU/mL of reduction or with the highest dose (160 J/mL). When

L. monocytogenes was inoculated into green tea, possible antilisterial effects naturally occurring in green tea were observed.

In this way, due to the significant differences ($p < 0.05$) between treatments T1, T2 and T3 despite using the same UVC dose, an attempt has been made to describe a phenomenon applicable to matrices with an absorption coefficient (254 nm) high, from which, with the same applied dose, higher lethality values were obtained by increasing the number of passes or NET value.

When the UHPH equipment was used to treat *A. niger* conidiospores with 200 MPa at 20°C and at 60°C inoculated in soymilk, a total logarithmic reduction of this microorganism was achieved. For the spores of *B. subtilis* inoculated in soymilk at different pressures (100 - 200 MPa) and at different temperatures (20 - 60 °C) no significant reductions were observed and the same happened when the same spores were inoculated in whole and skimmed milk and treated at 200 MPa at 60 °C.

By combining UHPH and UVC treatments for both conidiospores of *A. niger* inoculated in soymilk and spores of *B. subtilis* inoculated in soymilk, whole milk and skimmed milk, no synergistic effect was observed and for skimmed milk minor lethalties were reported when treated *a posteriori* with UVC radiation. Only when soymilk and whole milk were treated with UHPH at 200 MPa and 60 °C first and then treating the samples in the UVC reactor with the treatments T2 and T3, a slight additive effect was observed between the combined treatments.

When the temperature was combined (4, 20 and 55 ° C) during the UVC treatments carried out with green tea inoculated with *B. subtilis* spores, no synergistic or additive effect on the lethality of the microorganism was observed.

Índice de contenido

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Tecnologías térmicas	4
1.1. Calentamiento óhmico.....	7
1.2. Calentamiento por infrarrojo	7
1.3. Procesamiento por campos eléctricos de microondas y de radiofrecuencia ..	8
2. Tecnología de procesamiento no térmico.....	9
2.1. Procesamiento por alta presión hidrostática.....	9
2.2. Campos eléctricos pulsados de alta intensidad	10
2.3. Irradiación o radiación Ionizante.....	11
2.4. Plasma frío o no térmico (NTP)	12
2.5. Ultrasonidos	12
2.6. Luz pulsada	13
3. Radiación ultravioleta.....	13
4. Homogenización: Ultra Alta Homogeneización por Presión (UHPH).....	29
5. Combinación de tratamientos	32
II. HIPÓTESIS DE PARTIDA y OBJETIVOS	35
1. Hipótesis de partida	35
2. Objetivo general	36
3. Objetivos específicos.....	36
III. PLAN DE TRABAJO	37
IV. MATERIAL y MÉTODOS	42
1. Microorganismos utilizados en este estudio.....	42
1.1.1. Recuperación y preparación de inóculos	42
1.1.1.1 Conidioesporas de <i>A. niger</i>	42
1.1.1.2 Esporas de <i>B. subtilis</i>	43
1.1.1.3. Células vegetativas de <i>E. coli</i> y <i>L. monocytogenes</i>	44
2. Origen y preparación de las matrices utilizadas	44
2.1. Preparación del té verde	45
2.2. Leche entera y leche desnatada	45
2.3. Licuado de soja.....	45

3. Procedimiento de inoculación de las muestras	45
4. Análisis microbiológico de las muestras	45
5. Aplicación de los tratamientos con radiación UVC	46
5.1. Características del reactor UVC	46
5.2. Tratamientos de UVC aplicados a las muestras	47
5.3. Cálculo de la dosis en los tratamientos realizados	49
5.4. Determinación la intensidad recibida a las matrices	49
5.5. Determinación del grado de turbulencia del flujo	49
5.6. Cálculos de las dosis UVC e irradiancias de los tratamientos.....	50
5.4.1. Radiometría	50
2.4.2. Actinometría.....	50
6. Aplicación de los tratamientos UHPH	51
7. Combinación de tratamientos UHPH y UVC.....	52
8. Limpieza y desinfección de los equipos	52
9. Análisis para caracterizar las matrices.....	53
9.1. Absorbancia a 254 nm y espectro de absorción	53
9.2. Turbidez.....	53
9.3. pH	53
9.4. Viscosidad	53
9.5. Densidad	54
10. Análisis de los datos y obtención de modelos estadísticos.....	54
10.1. Análisis estadístico	54
10.2. Modelos estadísticos.....	55
10.3. Cinéticas de inactivación y cálculo del valor D_{UV}	55
V. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	60
1. Caracterización y evaluación del reactor UVC	60
2. Caracterización de las matrices utilizadas	66
3. Efecto de las matrices en <i>B. subtilis</i> según el tratamiento aplicado	68
3.1. Efecto de los tratamientos T1	69
3.2. Efecto de los tratamientos T2	70
3.3. Efecto de los tratamientos T3	71
3.4. Efecto general de las matrices	71
4. Efecto de los tratamientos UVC sobre esporas de <i>B. subtilis</i> en diferentes matrices	73

4.1. Té verde	73
4.2. Licuado de soja	75
4.3. Leche entera.....	76
4.4. Leche desnatada.....	77
5. Discusión del efecto de los tratamientos UVC sobre las esporas de <i>B. subtilis</i> en diferentes matrices	78
6. Efecto de los tratamientos UVC sobre conidiosporas de <i>A. niger</i> en té verde y licuado de soja	81
6.1. Té verde	81
6.2. Licuado de soja.....	82
7. Discusión del efecto de los tratamientos UVC sobre las conidiosporas de <i>A. niger</i>	83
8. Efecto de los tratamientos UVC sobre <i>E. coli</i> en té verde y licuado de soja	85
8.1. Té verde	85
8.2. Licuado de soja.....	86
9. Discusión del efecto de los tratamientos UVC sobre <i>E. coli</i>	87
10. Efecto de los tratamientos UVC <i>L. monocytogenes</i> en té verde y licuado de soja.....	89
10.1. Té verde	89
10.2. Licuado de soja.....	89
11. Discusión sobre el efecto de los tratamientos UVC sobre <i>L. monocytogenes</i>	91
12. Efecto de los tratamientos UVC en los microorganismos en función de la matriz tratada: té verde y licuado de soja	93
13. Modelización matemática de los tratamientos UVC	94
14. Cinéticas de inactivación y cálculo del valor $4D_{uv}$ para los diferentes tratamientos UVC.....	98
15. Efecto de los tratamientos UHPH y la aplicación combinada UHPH-UVC sobre esporas de <i>B. subtilis</i> en diferentes matrices	115
15.1. Resultados de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de <i>B. subtilis</i> en licuado de soja.....	115
15.2. Resultados de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de <i>B. subtilis</i> en leche desnatada.....	116
15.3. Resultados de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de <i>B. subtilis</i> en leche entera.....	117
16. Discusión sobre el efecto de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de <i>B. subtilis</i>	119
17. Efecto de los tratamientos UHPH, UVC y UHPH-UVC sobre conidiosporas de <i>A. niger</i> en licuado de soja.....	120

18. Discusión sobre el efecto de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre las conidiosporas de <i>A. niger</i>	122
VI. CONCLUSIONES	123
VII. BIBLIOGRAFÍA	123

Listado de Tablas

Tabla 1: Resumen de las diferentes técnicas que se han explorado y sus mecanismos fundamentales de inactivación microbiana. 3

Tabla 2: Parámetros cinéticos de inactivación de microorganismos en leche descritos por diferentes autores. 6

Tabla 3: Tratamientos térmicos más utilizados en leche. 6

Tabla 4: Características fisicoquímicas básicas de alimentos líquidos. 18

Tabla 5: Recopilación y cálculo de diferentes parámetros de UV junto a la inactivación microbiana en leche. 22

Tabla 6: Recopilación y cálculo de diferentes parámetros de tratamientos UVC junto a la inactivación microbiana en bebidas vegetales. 27

Tabla 7: Recopilación y cálculo de diferentes parámetros de tratamientos UVC junto a la inactivación microbiana en té rooibos 28

Tabla 8: Homogeneizadores de alta presión a nivel de planta piloto y a nivel industrial. Adaptado de Fernández Avila, 2016. 30

Tabla 9: Recopilación de algunos estudios que utilizaban la combinación de tecnologías de procesado. 34

Tabla 10: Características técnicas del reactor UV 47

Tabla 11: Desglose de las condiciones de tratamiento con las diferentes variables..... 48

Tabla 12: Cálculo del número de entradas y salidas del reactor o número NET y valor Reynolds de cada uno de las condiciones de tratamiento UVC. 62

Tabla 13: Cálculo de la distancia efectiva, expresado en mm dónde dosis recibida es próxima a 1 mJ/cm^2 64

Tabla 14: Cálculo de la probabilidad que una partícula se ubique en la zona efectiva (mm) según la matriz utilizada. 65

Tabla 15: Cálculo del valor NEZ para la dosis de 160 J/mL en cada uno de los tratamientos UVC (T1, T2 y T3). 66

Tabla 16: Principales características fisicoquímicas de las matrices utilizadas en este estudio. 67

Tabla 17: Efecto de la aplicación de la UVC en comparaciones dos a dos..... 68

Tabla 18: Resistencia de los diferentes microorganismos inoculados en té verde y licuado de soja a los tratamientos de UVC. 93

Tabla 19: Diferentes modelos matemáticos en función de la letalidad obtenida en las diferentes matrices después de los diferentes tratamientos llevados a cabo con el equipo de radiación UVC. Los datos destacados en negrita, representa el mejor ajuste para cada uno de los microorganismos y matrices testadas. 96

Tabla 20: Modelos matemáticos seleccionados con sus respectivas ecuaciones para cada una de las matrices y microorganismos evaluados.....	97
Tabla 21: Valores D_{uv} según el tipo de tratamiento, microorganismo, matriz y modelo aplicado.....	113
Tabla 22: Efecto de los tratamientos de UHPH sobre las características fisicoquímicas de las matrices.....	120

Listado de Figuras

- Figura 1:** Evolución del número de publicaciones relacionadas con la aplicación de tecnologías no térmicas en la industria alimentaria (Adaptado de Režek Jambrak, Vukušić, Donsi, Paniwnyk, y Djekic, 2018). 2
- Figura 2:** Cronograma de algunos hitos en el desarrollo de tecnologías térmicas y no térmicas en la industria alimentaria (Adaptación de Misra et al. (2016)). 4
- Figura 3:** Representación esquematizada del espectro electromagnético con sus correspondientes variables. 8
- Figura 4:** Espectro de radiación electromagnética con división del espectro de luz de luz ultravioleta en los cuatro tipos diferentes. 14
- Figura 5:** Espectros de salida de lámparas de mercurio de baja y media presión y espectros de acción microbiana (Adaptado de Kuo, Chen y Nellor, 2003). 16
- Figura 6:** Características básicas en los tratamientos UV. 20
- Figura 7:** Diseño experimental de todos los tratamientos realizados sobre licuado de soja. 39
- Figura 8:** Diseño experimental de todos los tratamientos realizados sobre leche entera y leche desnatada. 40
- Figura 9:** Diseño experimental de todos los tratamientos realizados sobre té verde. 41
- Figura 10:** Esquema de la sección interna de una de las lámparas del reactor UVC. ... 47
- Figura 11:** Espectro de absorción de las diferentes matrices utilizadas en este estudio con el espectro de emisión de la lámpara de LPM. 68
- Figura 12:** Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde, licuado de soja, leche entera y leche desnatada con el tratamiento T1 UVC a diferentes dosis (J/mL). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las matrices a igual dosis de UVC. 69
- Figura 13:** Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde, licuado de soja, leche entera y leche desnatada con el tratamiento T2 UVC a diferentes dosis (J/mL). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las matrices a igual dosis de UVC. 70
- Figura 14:** Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde, licuado de soja, leche entera y leche desnatada con el tratamiento T3 UVC a diferentes dosis (J/mL). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las matrices a igual dosis de UVC. 71

Figura 15: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 73

Figura 16: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde causados por el tratamiento T2 a diferentes dosis (J/mL) y diferentes temperaturas (4 °C, 20 °C y 50 °C). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos a la misma temperatura pero a diferentes dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas pero igual dosis de UVC. 74

Figura 17: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 75

Figura 18: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche entera causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuento iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 77

Figura 19: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche desnatada causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre

tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 78

Figura 20: Niveles de reducción de los recuentos de conidiosporas de *A. niger* inoculadas en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 82

Figura 21: Niveles de reducción de los recuentos de conidiosporas de *A. niger* inoculadas en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 83

Figura 22: Niveles de reducción de los recuentos de *E. coli* inoculado en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 85

Figura 23: Niveles de reducción de los recuentos de *E. coli* inoculado en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC. 86

Figura 24: Niveles de reducción de los recuentos de *L. monocytogenes* inoculado en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de

datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC..... 90

Figura 25: Valores de supervivencia observados (\diamond) de diferentes microorganismos después de la irradiación con UVC del tratamiento 1 (T1) con diferentes dosis en las matrices estudiadas. La línea negra representa la curva calculada según el modelo con el mejor ajuste en cada uno de los casos..... 102

Figura 26: Valores de supervivencia observados (\diamond) de diferentes microorganismos después de la irradiación con UVC del tratamiento 2 (T2) con diferentes dosis en las matrices estudiadas. La línea negra representa la curva calculada según el modelo con el mejor ajuste en cada uno de los casos..... 107

Figura 27: Valores de supervivencia observados (\diamond) de diferentes microorganismos después de la irradiación con UVC del tratamiento 3 (T3) con diferentes dosis en las matrices estudiadas. La línea negra representa la curva calculada según el modelo con el mejor ajuste en cada uno de los casos..... 112

Figura 28: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en licuado de soja causados por la combinación de los tratamientos UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con el tratamiento (T2). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) un mismo tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre un mismo tratamiento UHPH pero igual dosis de UVC..... 116

Figura 29: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche desnatada causados por la combinación del tratamiento UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con diferentes número de pases (T1 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH con los diferentes tratamientos UV (T1 y T3) pero a igual dosis de UVC. 117

Figura 30: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche entera causados por la combinación del tratamiento UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con diferentes número de pases (T1 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento

UHPH con los diferentes tratamientos UV (T1 y T3) pero a igual dosis de UVC.
..... 118

Figura 31: Niveles de reducción de los recuentos de conidiosporas de *A. niger* inoculadas en licuado de soja causados por la combinación de los tratamientos UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con el tratamiento (T2). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) un mismo tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre un mismo tratamiento UHPH pero igual dosis de UVC..... 121

Listado de Ecuaciones

Ecuación 1: Cálculo del valor D.....	5
Ecuación 2: Cálculo del valor Z.....	5
Ecuación 3: Cálculo de la letalidad microbiana	46
Ecuación 4: Cálculo de la intensidad recibida.....	49
Ecuación 5: Ley de Lambert-Beer.....	49
Ecuación 6: Cálculo del número Reynolds	49
Ecuación 7: Cálculo de la geometría anular	50
Ecuación 8: Cálculo de la actinometria	51
Ecuación 9: Cálculo de la viscosidad	54
Ecuación 10: Cálculo de la densidad.....	54
Ecuación 11: Modelo bifásico	56
Ecuación 12: Modelo lineal.....	56
Ecuación 13: Modelo lineal logarítmico con cola.....	57
Ecuación 14: Modelo lineal logarítmico con hombro	57
Ecuación 15: Modelo lineal logarítmico con hombro y cola	57
Ecuación 16: Modelo bifásico con hombro.....	58
Ecuación 17: Modelo de Weibull.....	58
Ecuación 18: Modelo de Weibull con cola.....	59
Ecuación 19: Modelo de Doble Weibull	59
Ecuación 20: Cálculo del valor NET.....	63
Ecuación 21: Cálculo del valor NEZ.....	65
Ecuación 22: Cálculo de la probabilidad de la zona letal (NEZ)	65

Listado de abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AENOR	Asociación Española de Normalización y Certificación
ANOVA	Ánalysis de la variancia
ARN	Ácido ribonucleico
Borato de sodio	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
cm	Centímetros
ECG	Epicatequina-3-galato
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> o Administración de Medicamentos y Alimentos (USA)
g	Gramo
g	Gravedades
GHz	GigaHercio
HTST	High Temperature Short Time
Hz	Hercio
Iodato de potasio	KIO_3
Ioduro de potasio	KI
J	Julio
JECFI	<i>Joint Expert Committee on Food Irradiation</i> o Comité Mixto de Expertos en Irradiación de Alimentos
Kg	Kilogramo

kGy	KiloGray
KH ₂ PO ₄	Fosfato de monopotasio
kHz	KiloHercio
kV	Kilovoltios
L	Litro
LMM	lámpara de mercurio de media presión
log	Logaritmo (en base 10)
LPM	Lámpara de mercurio de baja presión
LTLT	Low Temperature Long Time
m	Metro
M	Molar
MEA	Agar con extracto de malta
MHz	MegaHercio
MIC	Concentración mínima inhibitoria
min	Minutos
mJ	Milijulio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MnSO ₄ · H ₂ O	Sulfato de manganeso monohidrato
MPa	MegaPascales
mW	MiliVatio
MYA	Agar con extracto de levadura
N	Unidad Newton

Listado de abreviaciones

NB	Caldo nutritivo (Nutrient Broth)
NET	Número de Entradas al Túnel
NEZ	Probabilidad que una Partícula pase por Zona Letal del Túnel
nm	Nanómetros
NTP	Plasma no térmico o plasma frío
NTU	Unidades nefelométricas de turbidez
°C	Grado Celsius
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pa·s	Pascales por segundo
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PDA	Agar con dextrose de patata
Re	Número Reynolds
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPM	Revoluciones Por Minuto
RSME	Raíz cuadrada del error cuadrático medio
s	Segundo
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Tratamiento 3
T ^a	Temperatura
T ₀ ^a	Temperatura del tanque de alimentación durante el tratamiento UHPH

T ^a fi	Temperatura final del tratamiento UHPH (recogida muestras)
T ^a in	Temperatura inicial del tratamiento UHPH (justo antes entrada a la válvula UHPH)
T ^a va	Temperatura de la válvula del tratamiento UHPH (justo a la salida de la propia válvula UHPH)
TDT	Tiempo de Destrucción Térmica
TGB	Caldo de glucosa y triptona
TSA	Agar de Triptona y Soja
TSB	Caldo de triptona y soja
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UHPH	Ultra Alta Presión de Homoginación
UHT	Ultra High Temperature
UNE-EN	Una Norma Española- <i>European Norm</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> o Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Radiación ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta de tipo A
UVB	Radiación ultravioleta de tipo B
UVC	Radiación ultravioleta de tipo C
W	Vatio
µm	Micrómetro o micra

I. INTRODUCCIÓN

En los próximos 30 años se prevé que la población mundial alcanzará los 10 mil millones de habitantes (Misra, Schlüter y Cullen, 2016), por lo que es necesario crear nuevos enfoques en la producción y procesamiento de los alimentos. Cabe añadir que, a nivel mundial, un tercio de los alimentos se pierde en alguna etapa de su producción, procesamiento o transformación y a lo largo de su vida útil (Galankis, 2015). Por este motivo, tanto por parte de la industria alimentaria como por los centros de investigación, se están destinado grandes esfuerzos en mejorar las estrategias, herramientas y tecnologías en el ámbito de la conservación, seguridad y calidad alimentaria.

En la Unión Europea, la industria alimentaria es la principal actividad de la industria manufacturera, con un valor superior a los 1.109.000 millones de euros y con un incremento anual de entre un 0,8 y un 1% (Subdirección General de Fomento Industria e Innovación, 2015). En España, las industrias dedicadas al sector alimentario constituyen, según el estudio de Estadística Estructural de Empresas del Instituto Nacional de Estadística (Subdirección General de Fomento Industria e Innovación, 2015), la primera rama del sector industrial aportando al país un valor de 118.681,8 millones de euros, que representa un 23,5% del total del sector industrial. Por otra parte, el consumidor es cada vez más exigente respecto a la oferta que ofrece la industria alimentaria; productos frescos, innovadores, sin aditivos, de fácil consumo y mínimamente procesados, pero sin perder sus propiedades organolépticas originales. Además, la mitad de la población española manifiesta una preocupación respecto a su salud y a la manera que se está alimentando (Fundación Daniel y Nina Carasso, 2017).

A pesar de los grandes avances en la mejora y creación de nuevos productos, en la Primera Conferencia Internacional sobre la inocuidad alimentaria organizada por la FAO, se declararon que a nivel mundial hay 600 millones de casos anuales de enfermedades transmitidas por los alimentos (WHO, 2015). Por lo tanto, para la inocuidad alimentaria, es esencial el concepto “de la granja a la mesa” donde el desarrollo de nuevas tecnologías de procesado deben asegurar la eliminación, reducción o control de la microbiota patógena o alterante de los alimentos y de las superficies de contacto.

En estas últimas décadas, para poder dar soluciones alternativas a la situación expuesta anteriormente, se incrementaron los esfuerzos en investigar nuevas técnicas de procesado. Esta tendencia se demuestra con el aumento paulatino en el número de publicaciones relacionadas con la aplicación de nuevas tecnologías de procesado, especialmente en aquellas que utilizan mecanismos de inactivación no térmica (**Figura 1**). Las tecnologías no térmicas se basan en la aplicación de energía mecánica, eléctrica, presión o electromagnética para poder conseguir el mismo objetivo a la clásica transferencia de calor (**Tabla 1**).

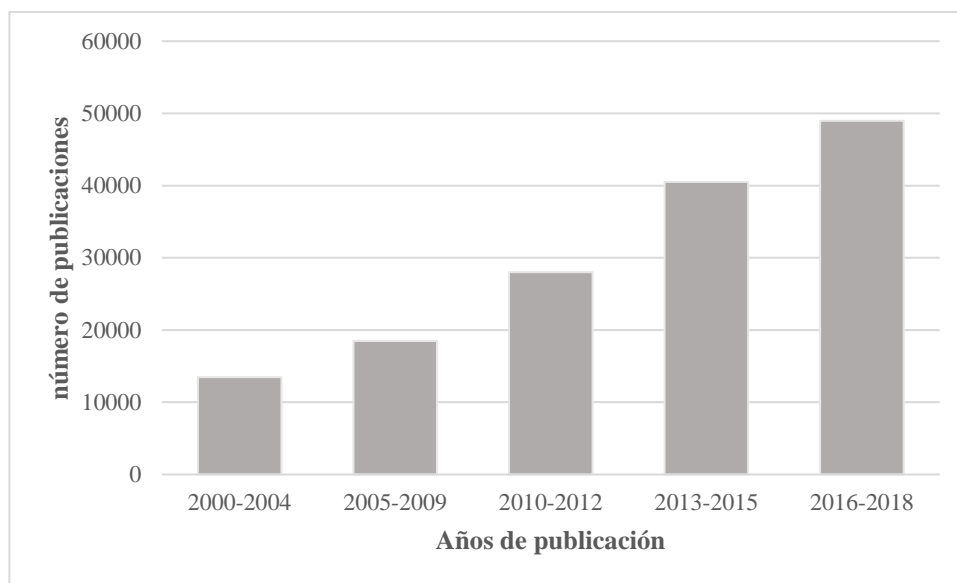


Figura 1: Evolución del número de publicaciones relacionadas con la aplicación de tecnologías no térmicas en la industria alimentaria (Adaptado de Režek Jambrak et al. 2018).

Tabla 1: Resumen de las diferentes técnicas de procesado y sus mecanismos fundamentales de inactivación microbiana.

Método de inactivación	Fundamento	Tecnología
Inactivación por temperatura	Transferencia térmica	Pasteurización
		Esterilización
	Energía electromagnética	Calor por infrarrojo
		Calor por microondas
		Calor por radiofrecuencia
	Energía eléctrica	Calor óhmico
Calor por conducción		
Inactivación no térmica	Energía electromagnética	Irradiación
		Luz UV
		Pulsos eléctricos
	Campos eléctricos	Ultrasonidos
		Campos eléctricos pulsados de alta intensidad
	Presión	Alta presión hidrostática
	Energía eléctrica o electromagnética	Plasma frío
Energía mecánica	Ultra homogenización por alta presión	

Las tecnologías no térmicas engloban todos los tratamientos de preservación que son efectivos a temperaturas ambiente, minimizando así los efectos negativos de los tratamientos térmicos en los parámetros nutricionales y de calidad de los alimentos. Un valor adicional de estas tecnologías de procesamiento no térmico es que permiten reducir la huella de carbono, el tiempo de tratamiento, el consumo de energía y la cantidad de agua utilizada por la industria alimentaria (Koutchma, 2014). Estos tratamientos cobran año a año más relevancia, tal como se observa en el esquema histórico de la **Figura 2** (Misra et al. 2016).

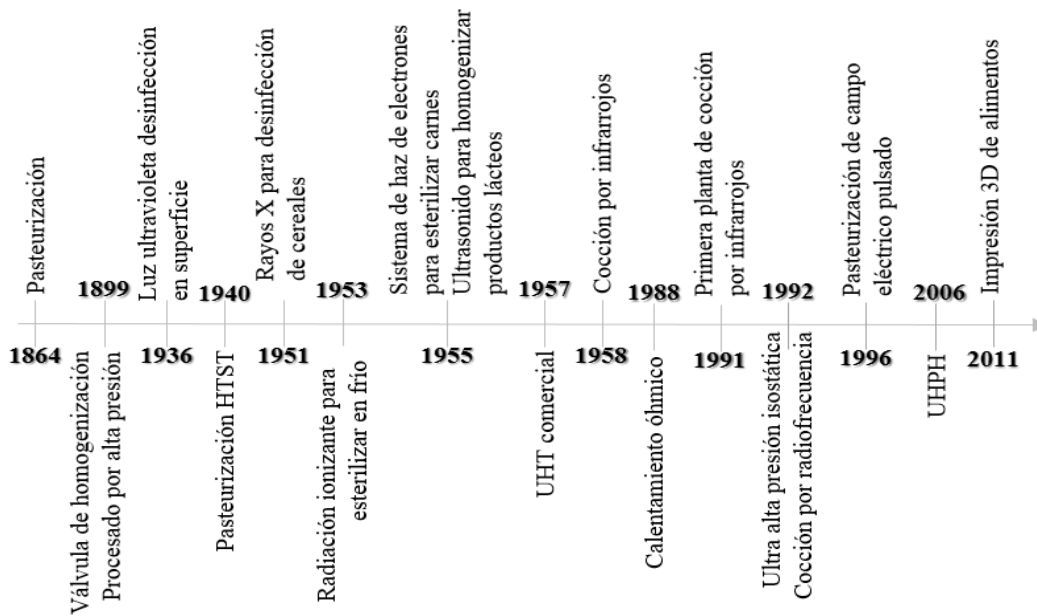


Figura 2: Cronograma de algunos hitos en el desarrollo de tecnologías térmicas y no térmicas en la industria alimentaria. Adaptación de Misra et al. (2016).

Para poder situar al lector con la variedad de nuevas tecnologías de procesado existentes a día de hoy, a continuación, se describirán brevemente algunas de las principales:

1. Tecnologías térmicas

De manera general, el uso de esta tecnología se basa en aplicar una temperatura durante un espacio de tiempo para poder eliminar y/o reducir un número concreto de microorganismos que pueden estar presentes en los alimentos, así como la inactivación de algunos procesos bioquímicos o enzimáticos, para así preservar y extender su vida útil. Los tratamientos térmicos más utilizados para eliminar o reducir los microorganismos en los alimentos son principalmente la pasteurización y la esterilización.

Al ser tecnologías ampliamente estudiadas, se han establecido diferentes parámetros, como el valor D y Z, para calcular el calor necesario para poder eliminar una cierta concentración en un espacio de tiempo determinado, definido como Tiempo de Destrucción Térmica (TDT). El valor D se define como el tiempo necesario que hay que aplicar a la matriz a una temperatura específica para poder reducir el 90% de la

concentración microbiana. Conociendo el número de células al inicio del tratamiento (N_0), y el número final de células supervivientes (N_x) después de aplicar el tratamiento durante un tiempo determinado (t) una temperatura determinada (T) se puede calcular el valor D a la temperatura T (**Ecuación 1**).

$$D_T = \frac{t}{\log(N_0/N_x)} \quad \text{Ecuación 1}$$

De esta manera, se pueden obtener diferentes valores D según la temperatura del tratamiento, el microorganismo y la matriz que se esté procesando. Una vez obtenidos diferentes valores D a diferentes temperaturas, se puede calcular el valor Z del tratamiento, que se define como la temperatura (expresada en $^{\circ}\text{C}$) que habría que incrementar en el tratamiento térmico para que el valor D se reduzca a la décima parte, tal como puede observarse en la **Ecuación 2**, donde ΔT expresa el incremento de temperatura, D_1 y D_2 los valores D obtenidos a dos temperaturas diferentes de tratamiento (t_1 , t_2).

$$Z = \frac{\Delta T}{\log(D_{t_1}/D_{t_2})} \quad \text{Ecuación 2}$$

Tanto el valor D como el valor Z varían dependiendo del microorganismo, presentando las esporas valores D mucho más altos que las células vegetativas. Una de las matrices donde más se ha estudiado la aplicación de tratamientos térmicos y los valores D y Z es la leche, tal como puede observarse en las **Tablas 2 y 3**.

Tabla 2: Parámetros cinéticos de inactivación de microorganismos en leche descritos por diferentes autores.

Microorganismo	Temperatura (°C)	D (minutos)	Z (°C)	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	62,8	0,13	4,6	Walstra et al. (1999)
	60	1,5	6,9	Toledo, (2006)
<i>Listeria monocytogenes</i>	65	0,1	6,6	Walstra et al. (1999)
	60	2,03	5,5	Toledo, (2006)
<i>Bacillus cereus</i>	95	1,8	9,4	Roberts et al. (1996)
Esporas de <i>B. cereus</i>	121	5,5	9,5	Walstra et al. (1999)

Tabla 3: Tratamientos térmicos más utilizados en leche.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo
Termización	63-65	15-30 s
Pasteurización LTLT (Low Temperature Long Time)	63-65	30 min
Pasteurización HTST (High Temperature Short Time)	72-75	15-20 s
Ultra pasteurización	125-138	2-4 s
Esterilización en envase (en continuo)	115-120	20-30 min
Ultra High Temperature (UHT)	135-140	2-4 s

Las tecnologías de intercambio térmicos han sido tradicionalmente las más utilizadas desde hace años, pero hay ciertas tecnologías consideradas emergentes que también usan la energía térmica para inactivar microorganismos y/o enzimas, entre ellas cabe destacar:

1.1. Calentamiento óhmico

El fundamento de esta tecnología se basa en el uso de corrientes eléctricas de muy baja frecuencia (de 50 a 60 Hz) a través del alimento, calentándolo de manera muy rápida y uniforme en comparación con otras tecnologías (Sastry, 2008). Debido a estas características, estos tratamientos tienen ventajas que repercuten directamente en una mayor calidad del producto en comparación a las tecnologías clásicas de procesamiento térmico, en las que la transferencia de calor, al ser más lenta, afectan a las características organolépticas del producto (Knirsch et al. 2010). Esta tecnología es relevante en alimentos en los que, por sus características o composición, la aplicación de los métodos térmicos convencionales presenta dificultades para obtener un intercambio de calor óptimo (Sastry, 2008). En su efecto de inactivación microbiana se observó que la letalidad de *Streptococcus thermophilus* en leche fue mayor que mediante procesos de calentamiento convencional (Sun et al., 2008). Se ha determinado que además de la inactivación debida al efecto térmico, también existen otros efectos no térmicos sobre las células biológicas, como son la electroporación, que explicarían su mayor eficacia (Sastry, 2008).

1.2. Calentamiento por infrarrojo

Las matrices alimentarias, al ser sometidas a longitudes de onda de entre 0,78 a 1000 μm , correspondientes a la radiación infrarroja (**Figura 3**), absorben toda su energía originando vibraciones mecánicas entre los diferentes enlaces de las moléculas, provocando una fricción elevada entre ellas, aumentando así la temperatura. Las ventajas de esta tecnología se basan en el rápido calentamiento en comparación con los tratamientos térmicos convencionales, lo que repercute en una mejor eficiencia energética de la tasa de transferencia y flujo de calor, lo que permite ahorrar tiempo y aumentar la velocidad de la línea de producción (Krishnamurthy et al. 2008). Sin embargo, esta tecnología tiene poca capacidad de penetración, por lo que no es posible su aplicación en matrices muy opacas o con alta turbidez (Sawai et al. 1996), siendo sólo aplicable para la descontaminación de superficies o de alimentos listos para su consumo pre o postenvasados.

Energía fotónica	Longitud de onda	Frecuencia	Nombre de la región electromagnética
E	λ	ν	
$e \cdot v$	μm	Hz	
$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = \frac{h}{T}$	$\lambda = \frac{c}{\nu} = c \cdot T$	$\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{E}{h} = \frac{1}{T}$	
10^3	10^{-3}	10^{17}	Rayos γ
100	0,01	10^{16}	Rayos X
10	0,1	10^{15}	UV
1	0,4 0,7		Espectro visible
0,1	1	10^{14}	
0,01	10	10^{13}	Infrarrojo
10^{-3}	100	10^{12}	
	10^3	10^{11}	Microondas
10^{-4}	10^4	10^{10}	Radioondas

Figura 3: Representación esquematizada del espectro electromagnético con sus correspondientes variables.

1.3. Procesamiento por campos eléctricos de microondas y de radiofrecuencia

La tecnología de las microondas cubre desde los 300 MHz hasta los 300 GHz del espectro electromagnético (**Figura 3**), pero para su aplicación en la industria alimentaria solo se permite el uso de las frecuencias comprendidas entre los 915 MHz y 2450 MHz, para evitar interferencias con los sistemas de telecomunicaciones (Moreno-Vilet, Hernández-Hernández y Villanueva-Rodríguez, 2018). A estas longitudes de onda se crea un campo magnético alterno, provocando un movimiento aleatorio entre las moléculas polares que provoca un cambio de su orientación, de hasta 2,45 billones de veces por segundo, lo que genera una gran fricción entre ellas, y en consecuencia, calor (Menéndez et al. 2010).

A nivel doméstico, en la que se aplican frecuencias de 2450 MHz, es una de las tecnologías de recalentamiento y cocción de alimentos sólidos, semisólidos y líquidos más utilizadas por su practicidad, alta velocidad de calentamiento y menor consumo de energía, comparado con los métodos térmicos convencionales, repercutiendo así en una mejor calidad organoléptica de los alimentos (Bornhorst et al. 2017). A nivel industrial, no obstante, la falta de uniformidad del producto causa diferencias en la sensibilidad a las radiaciones lo que provoca que se generen puntos de sobrecalentamiento. Además,

tiene una reducida capacidad de penetración (Tang, 2015), lo que influye de manera negativa en la calidad y seguridad del producto, acortando significativamente la vida útil del producto (Xuan et al. 2017).

Otra tecnología que comparte el mismo mecanismo de acción que las microondas es la radiofrecuencia, aunque en este caso las frecuencias utilizadas son inferiores en un intervalo de entre 3 KHz y 300 MHz (Piyasena et al. 2003) (**Figura 3**), aunque en las aplicaciones de la industria alimentaria la frecuencia se limita a 13,56, 27,12 y 40,68 MHz (Moreno-Vilet et al. 2018). Con esta tecnología, la distribución del calor es más homogénea y la penetración en el alimento es mayor que las microondas, lo que le permite una mayor aplicabilidad a nivel industrial (Luechapattanaporn et al. 2005). No obstante, debido a su alto gasto energético y diferentes problemas en el control de la energía térmica, que pueden provocar roturas dieléctricas (arcos eléctricos) y calentamientos térmicos descontrolados, su implantación a nivel industrial no se haya efectuado íntegramente (Ramaswamy y Tang, 2008).

2. Tecnología de procesamiento no térmico

Las tecnologías que no utilizan la energía térmica como mecanismo de acción han tenido una gran acogida en el área del procesamiento de los alimentos, ya que dan respuesta a la demanda de los consumidores de alimentos frescos, que conservan sus propiedades organolépticas y nutricionales (Misra et al. 2016).

La clasificación de estas tecnologías se puede hacer en base a los diferentes mecanismos de acción y a la fuente de transferencia de energía: formación de radicales o daño directo en el genoma mediante la formación de enlaces (plasma frío y luz ultravioleta); uso de campos eléctricos y magnéticos (campos eléctricos pulsantes); acción mecánica por ondas de choque (ultrasonidos) o por fricción, cizalla e impacto (homogeneización a ultra alta presión) y el uso de elevadas presiones (alta presión hidrostática) (Režek Jambrak et al. 2018).

2.1. Procesamiento por alta presión hidrostática

En el sector de la alimentación se consideran como “altas presiones” aquellas comprendidas entre los 100-1000 MPa, que pueden combinarse con temperaturas suaves o moderadas. En la actualidad las principales aplicaciones industriales se centran en tratamientos de alimentos ya envasados a presiones de entre 400-600 MPa durante 5-

10 minutos, para poder destruir la mayoría de las formas vegetativas de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* (Gervilla et al. 1997a), *Listeria innocua* (Gervilla et al. 1997b), *Staphylococcus aureus* (Gervilla et al. 1999). Las altas presiones interfieren en las funciones básicas de las células y provocan daño tanto a nivel de órganos citoplasmáticos (ribosomas) como en las membranas de éstas. La presión se aplica de manera uniforme en el alimento, manteniendo su forma geométrica. Sin embargo, a determinadas presiones se produce una cierta contracción, aunque si la despresurización es progresiva puede recuperar su tamaño inicial.

La inactivación de esporas bacterianas mediante alta presión en general es insuficiente, por lo que suele combinarse con del uso de altas temperaturas o con otros compuestos antimicrobianos (Capellas et al. 2000). Las presiones que puede alcanzar los equipos experimentales de laboratorio (hasta 900 MPa) (Koutchma et al. 2016) no pueden reproducirse, de momento, a escala industrial y por lo tanto cabe recurrir a otras tecnologías para poder inactivar los microorganismos resistentes a la presión. A pesar de estas limitaciones, hoy en día los tratamientos por alta presión se utilizan por parte de grandes empresas alimentarias, especialmente para productos muy sensibles a los tratamientos térmicos. El primer producto tratado con alta presión en la UE (zumo de naranja) se produjo en Francia en 1993 pero no fue hasta 1997, el Reglamento 258/97 de la UE sobre nuevos alimentos que entró en vigor el uso de esta tecnología. En Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó en 2001 su uso en concreto en los zumos de frutas (FDA, 2001).

2.2. Campos eléctricos pulsados de alta intensidad

Esta tecnología consiste en aplicar voltajes que van desde 1 a 100 kV/cm en un espacio de tiempo muy breve, generando así diferencias de potencial. Se basa en la conductividad eléctrica de las diferentes matrices alimentarias, debido a las altas concentraciones de iones y a su capacidad de transportar cargas eléctricas. Este mecanismo de acción tiene un impacto directo sobre la pared celular, provocando su electroporación y generando un incremento de permeabilidad en la membrana, que da como resultado su rotura, dejando las células muertas o con daños subletales (Wang et al. 2018). Durante la aplicación de este voltaje se genera calor, lo cual también puede contribuir a esta inactivación.

Sin embargo, este método no puede inactivar esporas por lo que debe combinarse con otras barreras tecnológicas (Zhao et al. 2013).

2.3. Irradiación o radiación Ionizante

Se basa en el principio de ionizar las moléculas a partir de su exposición a la energía electromagnética en una longitud de onda entre 10^{-10} y 10^{-12} metros (**Figura 3**). Por el efecto de la exposición se crean de cargas en las moléculas desplazando electrones y rompiendo los enlaces moleculares. También se forman "radicales libres", es decir, se cambia la posición de los electrones en las moléculas sin crear ninguna carga. Las dosis recibidas por parte del alimento pueden ir desde 1 hasta 10 kGy, límite que estableció el Comité Mixto FAO/OIEA/OMS de Expertos en Irradiación de los Alimentos (JECFI) en el año 1983. Años más tarde, en 2003, el *Codex Alimentarius* también adoptó la misma decisión (Ehlermann, 2016).

El mecanismo de acción de esta tecnología se basa en la interacción de la radiación con el agua de los alimentos generando productos radiolíticos, como por ejemplo: radicales hidroxilo, electrón hidratado y peróxido de hidrógeno, entre otros (Nair y Sharma, 2016). Por lo tanto, se crea un entorno muy reductor y oxidante, provocando así la inviabilidad de las células expuestas. Las células vegetativas presentes en los alimentos son muy sensibles a la radiación, mientras que los microorganismos formadores de esporas tienen mayor resistencia e incluso se pueden crear condiciones favorables para su germinación, crecimiento y producción de toxinas por parte de las esporas sobrevivientes, debido a que se eliminaría en gran medida la microbiota competidora (Nair y Sharma, 2016).

Hoy en día, los alimentos irradiados están muy estigmatizados socialmente por parte de los consumidores, quienes consideran que los alimentos irradiados suponen un riesgo para la salud, aportan menos beneficios y tienen una calidad inferior, mostrando una menor aceptación de esta tecnología (Bearth y Siegrist, 2019). No obstante, los compuestos tóxicos producidos en los alimentos irradiados también se encuentran en otros productos de manera natural o tras ser tratados por otras tecnologías de procesado (Nair y Sharma, 2016). Además, numerosos estudios demuestran los alimentos procesados por radiación ionizante, incluso utilizando dosis muy elevadas, siguen siendo más seguros para su consumo que sus equivalentes no irradiados (Ehlermann, 2016).

2.4. Plasma frío o no térmico (NTP)

Esta tecnología de procesamiento usa la energía eléctrica de alto voltaje para ionizar un gas, como el aire, con el fin de generar el cuarto estado de la materia: el plasma. Este estado gaseoso de energía está compuesto por varias especies atómicas, moleculares, iónicas y radicales excitados, que coexisten con numerosas especies reactivas, incluidos los electrones, iones positivos y negativos, radicales libres y átomos de gas, entre otros (Keener y Misra, 2016). Estas especies químicas contribuyen a que los microorganismos que entran en contacto con ellas sufran daños estructurales de membrana y en su actividad metabólica de manera irreversible, incluso en microorganismos esporulados (Patil, Bourke y Cullen, 2016), aunque las esporas fúngicas presentan más resistencia comparadas con las bacterianas (Dasan, Boyaci y Mutlu, 2016). Estos residuos químicos no afectan negativamente en las propiedades fisicoquímicas, fisiológicas y funcionales de los alimentos (Bourker et al. 2018).

Al ser una tecnología de procesamiento muy novedosa, aun esta en fase de estudio y regulación por parte de la administración pública, siendo necesario evaluar con más detalle la seguridad de los alimentos a nivel experimental antes de su implantación a nivel industrial (Keener y Misra, 2016).

2.5. Ultrasonidos

La tecnología de los ultrasonidos se basa en utilizar las ondas de sonido a una frecuencia por encima del umbral de audición humana (> 16 kHz). Mediante transductores ultrasónicos, la energía eléctrica se convierte en energía de sonido vibracional, que es capaz de propagarse por diferentes medios (Ojha, Tiwari, y O'Donnell, 2018). Esta característica vibracional crea microburbujas en los líquidos, creando un fenómeno conocido como cavitación que conduce a la creación de diferentes especies químicas, como radicales altamente reactivos (Ashokkumar, 2015). Aun así, comparado con el procesamiento térmico, el uso de ultrasonidos causa un daño mínimo en las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos, además de conseguir la inactivación microbiana, pero su uso está limitado a alimentos líquidos, como zumos de frutas o leche (Charoux, O'Donnell y Tiwari, 2017).

2.6. Luz pulsada

Esta tecnología utiliza el espectro de luz dentro de las longitudes de onda de 200 a 1000 nm, correspondientes a la luz ultravioleta, la luz visible y la infrarroja, aplicando sobre los alimentos pulsos de corta duración pero de alta potencia (John y Ramaswamy, 2018). Debido a que la aplicación de la energía eléctrica se realiza en forma de “flash”, se puede emitir la luz en forma de un solo pulso o una ráfaga de pulsos. Independientemente de cómo se realice esta aplicación, se ha demostrado que aplicándola de manera discontinua es al menos 20.000 veces más efectiva que aplicándola de manera continua con la misma energía total (Keener y Krishnamurthy, 2014). En los microorganismos puede inducir daños fotoquímicos, fototérmicos y/o fotofísicos, produciendo la muerte celular (Krishnamurthy et al. 2010).

Los principales beneficios de la aplicación de esta tecnología es la descontaminación de superficies de trabajo o de alimentos líquidos, pues son los que se necesitan tratamientos más cortos para lograr la inactivación microbiana con un reducido gasto energético (Koutchma, 2017).

3. Radiación ultravioleta

Otra tecnología de procesado que utiliza parte del espectro electromagnético es la luz ultravioleta (UV) en el intervalo de 100 a 400 nm. Dentro de este amplio rango, este espectro se puede subdividir en 4 partes dependiendo de las propiedades que le confiere la longitud de onda (**Figura 4**): (1) Entre 100 a 200 nm se denomina luz UV de vacío, ya que solo se puede transmitir en vacío y es absorbido por la mayoría de las sustancias. (2) El rango correspondiente a la luz UV de onda corta o UVC de 200 a 280 nm. Esta presenta un gran interés ya que tiene gran poder de inactivación microbiana. (3) El rango de 280 a 315 nm se corresponde a la luz UV de onda media o UVB, responsable de efectos dañinos sobre las células, provocando quemaduras en la piel, además ser un riesgo en el desarrollo de enfermedades como el cáncer de piel. (4) La luz UV de onda larga o UVA a longitudes de onda que van de los 315 a los 400 nm, que son las que se usan comúnmente para tratamientos de bronceado (Koutchma, Forney y Moraru, 2009).

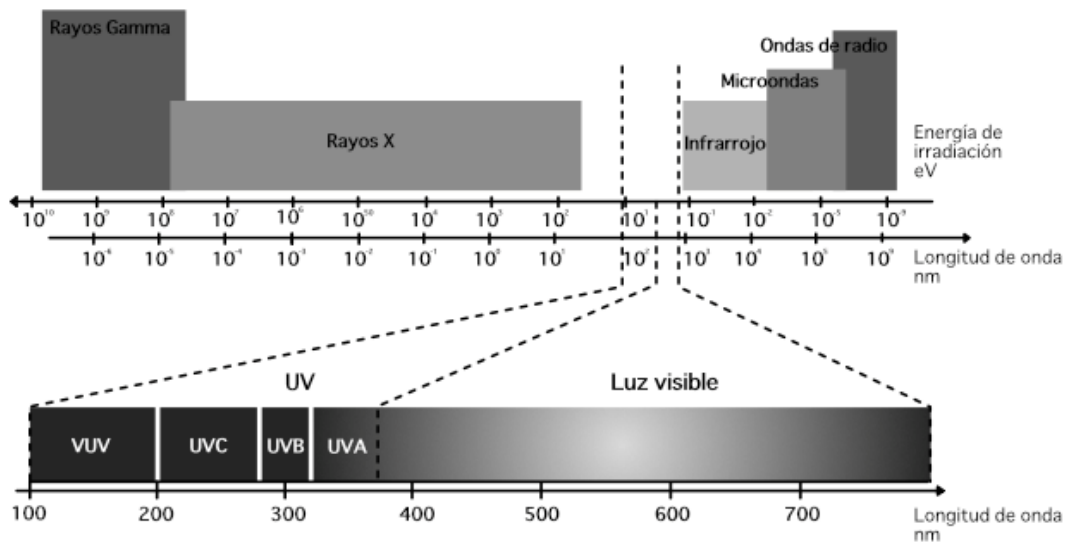


Figura 4: Espectro de radiación electromagnética con división del espectro de la luz ultravioleta en los cuatro tipos diferentes.

El fundamento básico del funcionamiento de las lámparas de luz UV es la descarga de energía eléctrica con un voltaje superior al potencial de ionización del gas que contiene la lámpara para poder excitarlo. El gas más utilizado es el mercurio, debido a que es volátil, inerte y con una energía de ionización baja. El gas de mercurio se combina con un gas de relleno, el argón, que favorece el inicio de la descarga y ayuda a su ionización.

Una vez se realiza la descarga eléctrica, el gas se transforma en una mezcla de átomos no excitados, átomos excitados, cationes y electrones libres. Cuando se aplica esta descarga eléctrica, los electrones e iones libres del gas se aceleran y generan altas energías cinéticas, llegando a ionizar. Es precisamente en este estado de ionización que se crean los fotones de luz UV, ya que al aumentar tan rápidamente el estado de excitación de los electrones y cationes, y luego producirse una descarga repentina retornando a su estado de energía basal, se provoca una descarga mantenida, denominada descarga luminiscente (Koutchma, 2014).

Al provocarse esta descarga luminiscente, los átomos e iones emiten fotones de luz UV que se van dispersando a lo largo de la lámpara e interactúan con el producto que se está tratando. En esta fase adquieren mayor relevancia los fenómenos de absorción, reflexión, refracción y dispersión, característicos de las tecnologías que basan su mecanismo de acción en la luz (fenómenos de ondas y fotones). Estos fotones liberados

por la lámpara y absorbidos por la matriz, provocan diversas reacciones fisicoquímicas. La cantidad de energía que puede absorber la matriz depende de diferentes factores, como el tipo de alimento y su manera de exponerse a la luz. La penetración de la luz y, por tanto, la efectividad del tratamiento en un alimento será mucho menor que en matrices homogéneas y transparentes.

Debido a que los productos alimentarios son matrices muy complejas, no toda la luz que emita el reactor penetra en la matriz. De esta manera, para poder calcular la intensidad de la luz UV que llega a la matriz, así como su penetración, se aplica la ley de Lambert-Beer (**Ecuación 5**), la cual tiene en cuenta el coeficiente de absorción de la matriz y la intensidad emitida por el reactor para así conocer la intensidad de luz UV que recibe la matriz en un punto determinado.

Para comparar los tratamientos descritos en otras investigaciones además de conocer la dosis que recibe la matriz, es necesario saber las características de la lámpara usada, como son: (1) la irradiancia, que es la cantidad de luz UV que incide sobre un área determinada (expresado en $\frac{W}{cm^2}$), (2) la longitud de la lámpara (expresado en cm), (3) la superficie de la lámpara (cm^2) y (4) la fuente de luz UV de la lámpara, es decir si es una lámpara de mercurio de baja presión (LPM), de media presión (LMM) o lámparas de excímer. Solo las lámparas de mercurio de baja presión se pueden utilizar en la industria alimentaria, siendo aprobadas por la FDA en el año 2001 y en Europa en el año 2016 su uso en leche (EFSA, 2016).

Las lámparas de mercurio de presión baja, a diferencia de las lámparas de mercurio de media presión, son capaces de emitir luz monocromática de manera continua a una longitud de onda de 253,7 nm. Esta longitud de onda está muy cerca de la longitud de onda de máxima absorción por los ácidos nucleicos de las células, que es de entre 260 y 265 nm. La efectividad de absorción disminuye a medida que la longitud de onda se va alejando de esta región (**Figura 5**) (Yin et al. 2015).

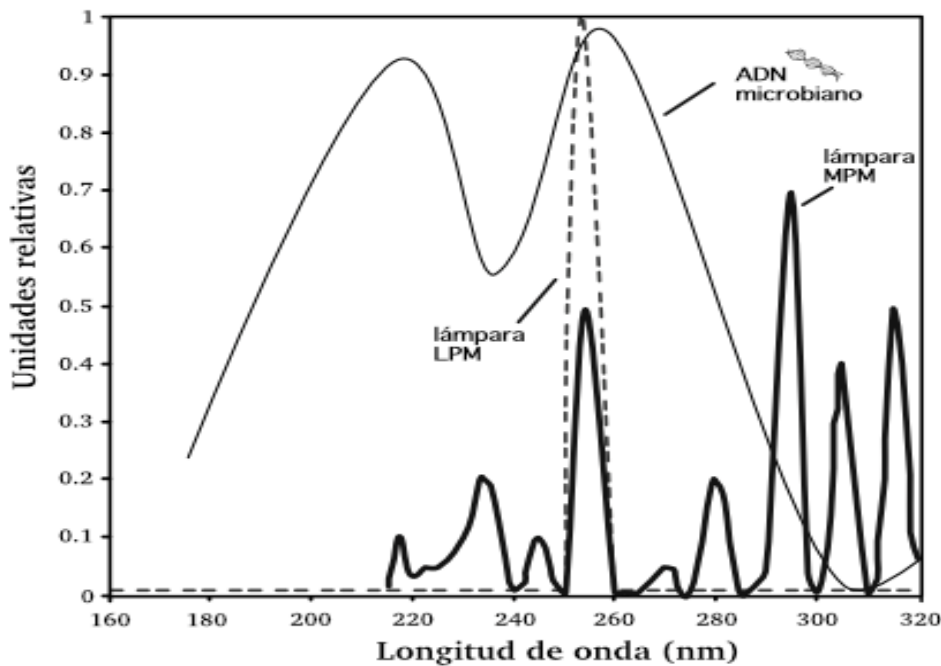


Figura 5: Espectros de salida de lámparas de mercurio de baja y media presión y espectros de acción microbiana (Adaptado de Kuo, Chen y Nellor, 2003).

El hecho que el material genético de las células tenga un espectro de absorción a estas longitudes de onda lo hace altamente susceptible a alteraciones en su cadena simple o doble de ADN. Estas alteraciones son debidas a los dos fenómenos principales asociados a la generación de peróxido de hidrógeno o aniones superóxido en las reacciones fotoquímicas: (1) interaccionan con las estructuras funcionales de los microorganismos y (2) forman enlaces covalentes entre las diferentes bases nitrogenadas, formando mayoritariamente dímeros de timina y pirimidina. Estos enlaces provocan que no se pueda efectuar ni la transcripción ni la replicación de los ácidos nucleicos, conduciendo así a la muerte celular de los microorganismos afectados. En algunos casos, cuando la dosis no es suficientemente alta, los microorganismos activan los mecanismos de reparación para revertir el daño causado por la radiación UV. A parte de los sistemas de reparación, los microorganismos tienen otras estrategias de protección frente a los rayos UV, como son las formas de resistencia o esporas, tanto bacterianas como fúngicas, y los pigmentos oscuros, como la melanina de algunos hongos, que tiene un alto nivel de absorbancia a las longitudes de onda del UV (Begum, Hocking y Miskelly, 2009).

Basado en estudios realizados en matrices que no interfieren en la efectividad de la luz UV, como el agua, se puede establecer una clasificación según su resistencia (de mayor

a menor): algas, protozoos, ooquistes de parásitos, mohos y levaduras, esporas bacterianas, bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y virus (Chevrefils et al. 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, aplicar la dosis correcta para provocar la muerte celular es fundamental para evitar posibles supervivientes, por lo que es necesario asegurar que los tratamientos se realizan correctamente. Los métodos más utilizados para poder determinar la dosis que se está administrando a una matriz son: (1) la radiometría, consistente en la detección mediante un sensor de la radiación emitida por superficie o, (2) la biodosimetría consistente en el cálculo de la letalidad de microorganismos inoculados en una matriz transparente, como puede ser el agua o una solución tampón, cuya finalidad es determinar una curva dosis-respuesta en relación al grado de inactivación observado y (3) la actinometría, que consiste en utilizar un compuesto químico sensible a la luz UV con el objetivo de observar de manera analítica los cambios fotoquímicos causados en el compuesto. Las moléculas químicas, al absorber los fotones, generan compuestos analizables mediante espectrofotometría, lo que permite estimar la cantidad de radiación UV que emite la lámpara por volumen.

Entre los parámetros que condicionan la efectividad de los tratamientos con luz UV, uno es la matriz alimentaria que se quiera tratar. De acuerdo con Koutchma, (2014), tanto las propiedades físicas como las químicas del producto pueden modificar significativamente la eficacia del tratamiento UV. De entre las propiedades fisicoquímicas, se puede destacar la concentración y tipo de sólidos disueltos y sólidos suspendidos, expresados en grados Brix, la absorbancia, el pH y la turbidez. En función del pH los alimentos líquidos se pueden clasificar en dos grandes grupos (1) los alimentos ácidos, con pH inferiores a 4,6, y (2) los alimentos no ácidos, con pH superiores a 4,6 de la matriz alimentaria (US FDA, 2004). Otras propiedades físicas que influyen en la eficacia de inactivación son la viscosidad y la densidad del producto. Así pues, para poder estudiar los fenómenos que son de relevancia durante los tratamientos de UV es necesario describir las características fisicoquímicas de la matriz con la que se está trabajando, como son: (1) el coeficiente de absorbancia a 254 nm, expresado en cm^{-1} , (2) la turbidez derivada de las partículas no solubles, expresada en unidades nefelométricas de turbidez o NTU, (3) la densidad del fluido, expresada en kg/m^3 y (4) la viscosidad del fluido, expresada en (Pa·s).

Bajo esta consideración, las matrices alimentarias líquidas se pueden clasificar en dos grandes grupos de alimentos: (1) matrices poco opacas o con una alta penetración de la luz UVC (transmitancia), como algunos zumos de frutas o el té, y (2) la matrices con un alto coeficiente de opacidad, como la leche o las bebidas o licuados vegetales. Un alto coeficiente de opacidad puede ser debido a su coeficiente de absorción o a la turbidez (o partículas en suspensión), suponiendo también una variable crítica en la eficacia de los tratamientos UVC (**Tabla 4 y Figura 6**). En la leche o los licuados de soja, que son fluidos opacos (baja transmitancia) también juega un papel muy importante los nutrientes disueltos en estas matrices líquidas, como los glóbulos grasos o las micelas de caseína en la leche, que provocan un efecto sombra durante el tratamiento, o el de las estructuras proteicas en el caso de la bebidas vegetales.

Por lo tanto, la elección de la matriz y los microorganismos es de gran importancia para poder seleccionar las condiciones y el tipo de reactor con el cual se van a aplicar los tratamientos.

Tabla 4: Características fisicoquímicas básicas de alimentos líquidos.

Matriz	Coefficiente de absorción a 254 nm (cm⁻¹)	Turbidez (NTU)	Viscosidad (Pa·s)	Densidad (kg/m³)	pH
Leche desnatada	170 ± 0,02	12000 ± 0,08	1,707 ± 0,01	1,037 ± 0,001	6,68 ± 0,01
Leche entera	321 ± 0,03	68680 ± 0,05	2,041 ± 0,01	1,030 ± 0,001	6,67 ± 0,01
Leche semidesnatada	210 ± 0,01	29000 ± 0,02	-	1,033 ± 0,001	6,67 ± 0,01
Horchata	193 ± 0,01	-	5,04 ± 0,001	-	6,5 ± 0,01
Bebida de soja	780 ± 0,04	65080 ± 0,03	4,047 ± 0,01	1,014 ± 0,001	6,34 ± 0,02
Bebida de arroz	159 ± 0,05	-	3,051 ± 0,001	1,014 ± 0,001	6,75 ± 0,01
Bebida de avena	198 ± 0,02	-	4,067 ± 0,001	1,015 ± 0,013	6,58 ± 0,01
Té verde	18,4 ± 0,02	213 ± 0,05	0,9101 ± 0,001	1,002 ± 0,001	6,67 ± 0,02
Té negro	24 ± 0,03	-	0,911 ± 0,001	1,002 ± 0,001	6,58 ± 0,01
Zumo de zanahoria	90,55 ± 0,40	> 11000	2,44 ± 0,01	1,032 ± 0,001	6,29 ± 0,01

NTU: Unidad nefelométrica de turbidez
 Recopilación de datos de diferentes fuentes: Matak y Churey, 2005; Codina-Torroella, 2014; Elbrhami et al., 2016; Riganakos et al., 2017; Datos propios.

Otro factor a tener en consideración, que permite contrastar diferentes estudios en los que se aplican tratamientos de UV son, además de las características de la lámpara, las características básicas del reactor, como: (1) el tipo de reactor, entendido como la geometría interna del mismo (anular, tubo enroscado, laminar...), (2) la distancia del camino óptico (espesor del alimento que debe atravesar la luz UV), (3) el número de lámparas o pases entre lámparas, (4) el tipo de régimen del flujo (laminar, turbulento...) o el número de Reynolds, (5) el caudal del fluido y (6) la temperatura del tratamiento **(Figura 6)**.

Los reactores de luz UV descritos en la literatura tienen cada uno sus características propias. A nivel de equipo experimental, se pueden agrupar los diferentes reactores en tres bloques: (1) sistemas de tratamiento por UV anulares de flujo laminar y turbulento, (2) sistemas “Dean flow” y (3) sistemas “Taylor-Coutte”. A nivel industrial, encontramos reactores de flujo laminar (CiderSure; FPE, NY, Estados Unidos e Ypsicon S.L., Barcelona, España), de módulo de Salcor (flujo de Dean en tubo enrollado, turbulento; California, Estados Unidos) y SurePure de flujo turbulento (SupePure Inc. Zug, Suiza).

Lámpara	Matriz	Reactor	Microorganismo
Irradiancia sobre el área (W/cm^2)	Coefficiente de absorbancia a 254 nm (cm^{-1})	Geometría interna del reactor	Género y especie microbiana
Longitud de la lámpara (cm)	Turbidez de partículas no solubles (NTU)	Distancia del camino óptico (mm)	Tipo de ADN/ARN (tamaño y geometría)
Superficie de la lámpara (cm^2)	Densidad (kg/m^3)	Número de lámparas o pases entre lámparas	Esporulado (estado)
Fuente de UV (tipo de lámpara)	Viscosidad (Pa·s)	Número Reynolds (según matriz)	Pigmentado
Refrigeración de la lámpara		Caudal (L/h)	Agregaciones o agrupaciones
		Tª del tratamiento	Concentración inicial

NTU: Unidades nefelométrica de turbidez

Figura 6: Factores que afectan a la eficacia de los tratamientos UVC.

La leche ha sido uno de los alimentos líquidos de alta opacidad que más se ha estudiado en el campo de la luz UV. Ya desde el año 1928, Steenbock, científico alemán, fue el primero en utilizar la luz UV para poder reducir la carga microbiana de la leche sin pasteurizar. Este autor ya advirtió que el aumento de dosis de UVC para poder conseguir unos buenos valores de inactivación bacteriana en la leche daba lugar a olores y sabores desagradables debido a la sobreexposición de ésta a la radiación UV. Más adelante, en el año 1949, un científico alemán llamado Lembke fabricó el primer reactor con capacidad bactericida en leche cruda y pudo demostrar a su vez, que la longitud de onda óptima era de 253,7 nm confirmando la hipótesis de Capstick (1946). Este autor señaló que el espacio efectivo, o la penetración de la luz UVC en la leche era de tan solo 1 mm debido a su gran opacidad. Ante la imposibilidad de crear un reactor con un diámetro interno tan pequeño, desarrolló un reactor con la capacidad de crear flujo turbulento en el diámetro de 1 cm, para así crear una frecuencia de exposición más alta que con flujo laminar.

A pesar de que esta tecnología tiene un gran bagaje histórico, a día de hoy, los tratamientos térmicos son los únicos que se aplican comercialmente en la leche, ya que

su eficacia con los microorganismos patógenos ha sido ampliamente probada. Para poder lograr el objetivo de conseguir una leche con características organolépticas similares a la leche cruda, sin comprometer la seguridad del producto, se han aplicado diferentes tratamientos por luz UV, aunque no hay un consenso generalizado sobre las dosis empleada y la efectividad del tratamiento (**Tabla 5**).

Tabla 5: Recopilación y cálculo de diferentes parámetros de UV junto a la inactivación microbiana en leche.

Matriz	Abs (cm ⁻¹)	Caudal (L/h)	Dosis total	n° de pases	Diámetro interno (mm)	Re	T ^a (°C)	Microorganismos testados	Reducción logarítmica	Tipo de reactor	Referencia
Leche desnatada (0% grasa)									2,27		
Leche semidesnatada (2% de grasa)	-	151	5,8 mJ/cm ²	1	9	1371	-	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1,43	CiderSure 3500 UV processor	Matak, (2004)
Leche entera (3,25% de grasa)									1,44		
Leche de cabra cruda (4,13% de grasa)	-	567	15,8 ± 1,6 mJ/cm ²	12	9	5187	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	5,62	CiderSure 3500 UV processor	Matak y Churey, (2005)
Leche de vaca cruda	-	3960	30 W	10	-	-	38	Vialbes totales	1,92	sistema PureUV (flujo en espiral)	Reinemann et al. (2006)
								<i>E. coli</i> /Coliformes	2,53/2,48		
								Esporas aerobias mesófilas	0,36		
								Bacterias psicótrofas	2,08		
							Bacterias termófilas	1,42			
Leche cruda de vaca	-	40	3 pulsos por segundo a 1,27 J/cm ²	2	11,4	-	21	<i>Staphylococcus aureus</i>	5,87 ± 0,08	Radiación policromática (100 hasta 1100 nm) con el modelo SteriPulse-XL 3000	Krishnamurthy, Demirci, y Irudayaraj, (2007)
Leche entera (4% de grasa)	300								2,6	Reactor UV hecho a medida (Iatros Limited, Dundee, Escocia)	Altic et al. (2007)
Leche semidesnatada (1,7% de grasa)	-	10,08	2860 mJ/mL	16	-	-	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	2,8		

Leche entera UHT	-	4000	22,95 J/L cada pase	80	-	>7000	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	0,5 - 2	Reactor UV hecho a medida con tubo en espiral corrugado	Donaghy et al. (2009)
		6,8		21,3					3,9		
		17,3		20,8					6		
		28,8	21,3 mJ/cm ²	20,5	1,5				6,5		
		28,8	20,8 mJ/cm ²	20,5	3				4		
		28,8	20,8 mJ/cm ²	20,5	2			<i>E. coli</i>	6,2		
								<i>L. monocytogenes</i>	3,9		
								<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3,7	Dean vortex o flujo en espiral	Lu, Li, y Liu, (2011)
								<i>E. coli</i>	4,3		
								<i>S. aureus</i>	4,5		
								<i>Salmonella enterica</i> var. Typhimurium	3,8		
								<i>Shigella flexneri</i>	5,1		
								<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,5		
Leche entera de vaca UHT		28,8	21,7 mJ/cm ²	20	1,5	>2500	25	<i>Lactococcus lactis</i>	3		
								<i>E. coli</i> W 1485	4,14		
Leche de vaca cruda (4%)	220	6			1,6	713	24-26	Esporas de <i>Bacillus cereus</i>	2,65		
		12	11187 mJ/cm ²	-	3,2	713		<i>E. coli</i> W 1485	1,19	Reactor Dean flow o flujo esprial	Choudhary et al. (2011)
								Esporas de <i>B. cereus</i>	1,72		
Leche de vaca desnatada (0,1 %)	170	4,5				532		<i>E. coli</i> W 1485	7,78		
		6			1,6	1064		Esporas de <i>B. cereus</i>	2,72		

		12			3,2	1064		<i>E. coli</i> W 1485	2,43		
								<i>Esporas de B. cereus</i>	1,78		
Leche cruda de vaca (3,32% de grasa)	-	65,4	13,87 J/mL	1	-	-	5	Aerobios mesófilos	Aerobios mesófilos: 3,16	Reactor UV de tubo enrollado hecho a medida diseñado por el Sr. Yusuf Koprulu	Engin et al. (2012)
								Coliformes totales	Coliformes totales: <1		
								<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> : <1		
								<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.: <1		
								Mohos y levaduras	Mohos y levaduras: 3,78		
Leche entera (3,5% de grasa)	-	4300	1760 J/L	-	5	> 7500	6	Aerobios mesófilos	0,26	Reactor UV de bajo consumo SP-4 (SurePure, Milnerton, Sudafrica)	Rossito et al. (2012)
								Microbiota después de la pasteurización	0,88		
								Esporas aerobias mesófilas	0,44		
Leche desnatada (2% de grasa)								Aerobios mesófilos	0,75		
								Microbiota después de la pasteurización	1,22		
								Esporas aerobias mesófilas	0,51		
Leche entera comercial pasteurizada y homogenizada (3,25% de grasa)	-	3900	135 J/ cm ²	120	-	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	3,2	Reactor UV de flujo continuo a escala piloto	Pereira et al. (2014)
								<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,8		
								<i>S. Typhimurium</i>	3,7		
								<i>S. aureus</i>	3,4		
								<i>E.coli</i>	2,8		
								<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,4		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,8										

Leche de vaca cruda (3,6% de grasa)	-	4000	430 mJ/cm ²	40	5	>7000	-	Aerobios totales	Aerobios totales: 0,75	Surepure 40 Turbulator™ system (SP-40)	Cilliers et al. (2014)
								Coliformes	Coliformes: <1		
								Esporas aerobias mesófilas	Esporas aerobias mesófilas: <1		
Leche de vaca entera pasteurizada (3,25% grasa)	476,2	-	4,0 mJ/cm ²	-	-	-	20	Esporas anaerobias mesófilas	Esporas anaerobias mesófilas: <1	Placa de petri estéril	Yin et al. (2015)
			7,9 mJ/cm ²					<i>E. coli</i> O157:H7	1,81		
			2000 J/L					<i>L.monocytogenes</i>	2,38		
Leche de vaca cruda	-	4300	1950 J/L	20	5	> 7500	-	<i>Serratia marcescens</i>	5 log	Reactor thin-film de flujo turbulento diseñado y fabricado por SurePure.	Crook et al. (2015)
			1550 J/L					<i>Salmonella enterica</i> var. Senftenberg			
			1500 J/L					<i>Yersinia enterocolitica</i>			
			1450 J/L					<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>S. aureus</i>			

A pesar de la heterogeneidad de los resultados debido a la utilización de diferentes reactores, diferentes caudales y diferentes dosis, se puede observar que los microorganismos en forma vegetativa presentan un grado de sensibilidad mayor que los microorganismos esporulados (Choudhary et al. 2011). Ello se evidencia en diversos estudios en los que se evaluó la efectividad de otros patógenos característicos de la leche, en especial *Mycobacterium* spp, en los que se concluyó que por el diseño del reactor y las variables elegidas del tratamiento UVC, esta tecnología no era una buena alternativa a la pasteurización (Altic, Rowe y Grant, 2007; Donaghy et al. 2009; Pereira et al. 2014). Sin embargo, en otros estudios la letalidad obtenida para otros patógenos fue elevada. Así, Crook et al. (2015) utilizando un reactor UVC con flujo turbulento con diferentes pases o ciclos en leche de vaca cruda, obtuvieron una letalidad 5 unidades logarítmicas de diferentes patógenos bacterianos como *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Y. enterocolitica* y *L. monocytogenes*. Este último fue el que presentó la mayor resistencia debiendo aplicar una dosis de 2000 J/L para conseguir 5 log de reducción. Matak y Churey (2005) también obtuvieron reducciones de *L. monocytogenes* superiores a los 5 log en leche de cabra cruda, aplicando una dosis de $15,8 \pm 1,6$ mJ/cm².

A diferencia de la leche, en otras matrices alimentarias estudiadas en esta tesis como son el licuado de soja y té verde, hay muy pocos estudios en el campo de los tratamientos por luz UVC como se muestra en la **Tabla 6** y **7**. El estudio del efecto de los tratamientos de UVC en dichas matrices, pueden ser de gran interés, tanto desde el punto de vista nutricional, económico y de consumo por parte de la población mundial. De hecho, el té es la bebida más consumida en el mundo después del agua, con un consumo anual de 3,5 millones de toneladas (Wang et al. 2012) y el consumo de bebida de soja está incrementando, en parte debido a la gran producción de haba de soja que ha sido en este último año de más de 313 mil millones de toneladas (USDA 2018).

Tabla 6: Recopilación y cálculo de diferentes parámetros de tratamientos UVC junto a la inactivación microbiana en bebidas vegetales.

Matriz	Abs (cm ⁻¹)	Caudal L/h	Dosis	n° de pases	Diámetro interno (mm)	Re	T ^a (°C)	Microorganismos testados	Reducción logarítmica	Tipo de reactor	Referencia
Licuado de soja	159	6	11.187 mJ/cm ²	-	1,6	1376	26–30	<i>E. coli</i> W 1485	5,6	Reactor Dean flow o flujo esprial	Bandla et al. (2012)
		12			Esporas de <i>B. cereus</i>			3,22			
					<i>E. coli</i> W 1485			295			
					Esporas de <i>B. cereus</i>			1,66			
Horchata	-	-	4.230 mJ/cm ²	-	-	-	27	Mohos y levaduras	3	Cámara oscura con placas de Petri	Corrales et al. (2012)
								Psicrótrofos	3,5		
								Mesófilos	4,7		
Licuado de soja	162,01	90	4,45 mJ/cm ²	10	3,3	53,17	21,8 ± 0.5	<i>E. coli</i> ATCC 8739	>0,5	Taylor–Couette UV	Orlowska et al. (2014)
Horchata	193	6,48	18,4 mJ/cm ²	1	29,3	110,8	-	<i>E. coli</i>	5,06	Reactor Dean flow o flujo esprial	Elbrhami, (2016)
								<i>L. monocytogenes</i>	5,43		
								Aerobios totales	3,5		

Tabla 7: Recopilación y cálculo de diferentes parámetros de tratamientos UVC junto a la inactivación microbiana en té rooibos

Matriz	Abs (cm ⁻¹)	Caudal (L/h)	Dosis	n° de pases	Diámetro interno (mm)	Re	T ^a	Microorganismos testados	Reducción logarítmica	Tipo de reactor	Referencia
Té rooibos	-	4000	936 mJ/cm ²	40	-	7500	-	<i>Salmonella</i> spp.	3,06	Reactor UV hecho a medida con tubo en espiral corrugado fabricado por Sure PureUV	Monyethabeng y Krügel, (2016)
								<i>S. aureus</i>	2,49		
								<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,12		
								<i>Cladosporium</i> spp.	2,98		
			1.836 J/L ó 1.872 mJ/cm ²	80				<i>E. coli</i> K12	3,16		
								<i>Salmonella</i> spp.	4,01		
								<i>S. aureus</i>	3,91		
								<i>S. cerevisiae</i>	4,79		
			2.754 J/L ó 2.808 mJ/cm ²	120				<i>Cladosporium</i> spp.	1,78		
								<i>E. coli</i> K12	3,85		
								<i>Salmonella</i> spp.	4,43		
								<i>S. aureus</i>	4,31		
			3.672 J/L ó 3.744 mJ/cm ²	160				<i>S.cerevisiae</i>	>1		
								<i>Cladosporium</i> spp.	1,2		
								<i>E. coli</i> K12	3,87		
								<i>Salmonella</i> spp.	4,57		
		<i>S. aureus</i>	4,34								
		<i>S. cerevisiae</i>	>1								
		<i>Cladosporium</i> spp.	0,29								
		<i>E. coli</i> K12	4,37								

4. Homogenización: Ultra Alta Homogeneización por Presión (UHPH)

Esta tecnología no térmica de tratamiento de alimentos líquidos, se basa en un proceso de homogenización utilizando la alta presión centralizada como fenómeno de impulsión del alimento o matriz (100-400 MPa). Esto obliga a la matriz a pasar por un espacio reducido, lo que genera fenómenos físicos; como son la reducción del tamaño de partícula, cizalla, impacto, fricción, cavitación y homogeneización de sus compuestos en las partículas suspendidas, generando así la estabilización física y la reducción de la carga microbiana en las matrices alimentarias.

La tecnología de homogeneización fue desarrollada por Auguste Gaulin en el año 1899 (Patente nº. 295.596), quien creó la primera válvula de homogeneización capaz de alcanzar presiones de 30 MPa. A partir de ese momento muchas empresas de la industria química, farmacéutica y alimentaria la han aplicado con el objetivo de obtener productos con las características fisicoquímicas deseadas y estables.

En la actualidad se han desarrollado diferentes equipos que pueden trabajar a altas presiones de homogenización (**Tabla 8**), uno de los primeros fue el Microfluidizer (Microfluidics International Corporation) en el año 1987. Inicialmente los equipos no superaban presiones de 100 MPa, pero en la actualidad ya alcanzan hasta los 300 MPa trabajando con caudales de 2000 L/h. Otros equipos que se encuentran actualmente en el mercado es el Emulsiflex (Avestin) que alcanzan presiones de 220 MPa con caudales de 1000 L/h, los fabricados por la empresa Stansted (Stansted Fluid Power Ltd) que pueden alcanzar presiones de 300 MPa y con caudales que pueden alcanzar los 240 L/h, y finalmente el de la empresa Ypsicon (Ypsicon Advanced Technologies, S.L., Barcelona, Spain), que desarrolla equipos capaces de trabajar a presiones de hasta 350 MPa, con escalados de hasta los 10000 L/h.

Tabla 8: Homogeneizadores de alta presión a nivel de planta piloto y a nivel industrial. Adaptado de Fernández Avila, (2016).

Empresa	Modelo	Presión (MPa)	Caudal (L/h)
Microfluidics (EEUU)	Microfluidizer M-7250	300	2000
BEE International (EEUU)	DeBEE 2000P-250/45	310	1500
Avestin (Canada)	EmulsiFlex-C1000	220	1000
Gea Niro Soavi (Italia)	Ariete NS5355	150	60000
APV (Reino Unido)	Rannie 75	150	800
Stansted Fluid Power (Reino Unido)	SPF-nG11300	300	240
Ypsicon (Spain)	UHPH-10000	350	10000

El mecanismo fundamental de esta tecnología se basa en generar una presión muy elevada, debido a la unión de una aguja con su asiento. El fluido es bombeado por unos pistones y obligado a pasar por esta aguja hasta llegar al espacio de encuentro entre el cabezal de la aguja y el asiento de la válvula. Al disminuir repentinamente el espacio se genera una elevada presión, provocando una combinación de fuerzas, las cuales modifican las propiedades fisicoquímicas de la matriz y producen la muerte de los microorganismos. Los principales fenómenos que se crean cuando el alimento es forzado a pasar por el espacio son: (1) fuerzas de fricción, entendidas como la fuerza de rozamiento que la matriz sufre al pasar entre la superficie de la aguja con la superficie del asiento, (2) fuerzas de cizalla o esfuerzo cortante, que es la tensión que se genera cuando entran en contacto directo el cabezal de la aguja con el asiento, (3) fuerzas de impacto, que se generan cuando la matriz consigue pasar por el asiento de la aguja y posteriormente, al aumentar de manera repentina el espacio físico, choca a gran velocidad (hasta 3 veces la velocidad del sonido) contra las paredes de la válvula del equipo, y (4) fuerzas de cavitación, generadas por las burbujas que se forman al aumentar y después disminuir de manera repentina la presión. Cabe destacar que la magnitud de estos fenómenos dependen en gran medida del diseño de los componentes de la válvula, como son la geometría de la aguja y el asiento, o el material de construcción de los mismos (Dumay et al. 2013).

Además de los fenómenos detallados anteriormente, también se genera energía térmica durante el proceso, en aproximadamente unos 2-2,5 °C por cada 10 MPa de presión

aplicados a la matriz. En matrices sensibles al calor, este incremento térmico puede reducirse enfriando la matriz antes del tratamiento y controlando el nivel de calentamiento al pasar por la válvula emplazando intercambiadores de calor con fluido refrigerante. De esta manera, se impide que el aumento temperatura pueda afectar a las propiedades organolépticas o nutricionales del alimento que se está tratando. No obstante, desde el punto de vista de la efectividad del tratamiento en la inactivación de microorganismos indeseables, el aumento de temperatura puede ser relevante al producirse efecto sinérgico con el resto de fenómenos físicos asociados a este tratamiento tecnológico (Roig-Sagués et al. 2009).

El nivel de letalidad alcanzado depende de diferentes factores relacionados con el proceso: 1) la temperatura de entrada del producto en el equipo, 2) la presión de homogenización con la que se trata el producto, 3) la geometría-diseño de la válvula de homogenización (aguja y asiento), y el material de fabricación (metálicos, cerámicos, mezclas...), 4) la aplicación de dos o más válvulas consecutivas, 5) la aplicación o no de tiempo de retención antes de enfriar producto y 6) el número de pases o ciclos que se realicen en el equipo de UHPH. Otros aspectos son las características propias de los microorganismos, como: 1) la composición de la membrana celular y/o presencia de pared (Gram positivos) y/o formación de esporas y 2) el tamaño y forma de la célula microbiana (cocos, bacilos...). Por último se deben considerar las características fisicoquímicas de la matriz, como: 1) la presencia de inhibidores o conservantes naturales, 2) el pH, 3) la viscosidad y 3) el tamaño de las partículas presentes en la matriz.

Diversos autores han trabajado con esta tecnología, procesando diferentes matrices alimentarias. Los resultados indican que la UHPH parece una buena alternativa a la pasteurización térmica para poder conservar alimentos líquidos (Pereda et al., 2007; Cruz-Cansino, 2009; Suárez-Jacobo et al. 2010; Codina-Torrella, 2014; Roig-Sagués et al. 2015). En la mayoría de estos estudios cabe concluir que las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto presentan una mejora significativa en comparación con las tecnologías de procesado térmico, respetando el deseo de los consumidores de adquirir productos de características similares a los alimentos frescos (Codina-Torrella, 2014).

En la leche, la aplicación de la UHPH parece una buena opción a la pasteurización convencional, respetando las características organolépticas y fisicoquímicas de la leche cruda (Thiebaud et al. 2003; Hayes, Fox, y Kelly, 2005; Picart et al. 2006; Pereda et al.

2008; Amador Espejo et al. 2014). También ha mostrado buenos resultados en otras matrices líquidas como los licuados vegetales de soja, almendra, arroz y chufa asegurando su estabilidad física y microbiológica con una efectividad similar a una pasteurización (Cruz-Cansino, 2009; Poliseli-Scopel, 2012; Hernández-Herrero, Guamis, y Ferragut, 2012; Codina-Torrella, 2014; Valencia-Flores, 2015). Sin embargo, su efecto sobre las esporas bacterianas, es mucho más limitado, y solo se logra la esterilización comercial del producto cuando se combinan con altas temperaturas de entrada del producto, aprovechando el efecto sinérgico del tratamiento UHPH y la temperatura. Poliseli-Scopel et al. (2012 y 2014), consiguieron la inactivación de hasta 2 log UFC/mL de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, con combinación de presiones de 300 MPa y temperaturas de entrada de 80°C, alcanzando temperaturas durante el paso de la válvula superiores a los 140°C. Por otra parte, Chaves-López et al. (2009) describe que la aplicación de ciclos o pases en el tratamiento es otra alternativa para poder llegar a reducciones de esporulados de 5 log UFC/mL a temperaturas más bajas y a presiones de 150 MPa, aunque este tipo de aplicación a nivel industrial actualmente no parece ser viable (Dumay et al. 2013).

5. Combinación de tratamientos

En los últimos años, se ha avanzado significativamente en materia de innovación tecnológica en el procesado de alimentos, combinando nuevas tecnologías con la finalidad de lograr efectos sinérgicos, aditivos o complementarios. El objetivo de combinar dos o más tecnologías es conseguir una mayor eficacia en la inactivación microbiológica, aplicando condiciones de tratamiento más suaves, para así preservar la estabilidad fisicoquímica de los alimentos. Este tipo de enfoque se le llama “tecnología de las barreras u obstáculos” (Hurdle technology) (Maktabi, Watson y Parton, 2011; McKay, 2016).

Con la combinación de dos o más tecnologías de procesado se pretende también disminuir el desgaste de los equipos de trabajo. De esta manera, las condiciones de los tratamientos pueden ser menos extremas que si se trabajan de manera individualizada.

De manera general, el uso de la luz UVC juntamente con otras tecnologías de procesado aumenta la inactivación microbiana (**Tabla 9**), pero los efectos no siempre son sinérgicos, sino que muchas veces se observa un fenómeno sumatorio (aditivo) entre las dos tecnologías estudiadas. (Colejo et al. 2018) observaron un efecto aditivo cuando se

combinaba la radiación UVC con el plasma frío en salmón ahumado. Con anterioridad, Gachovska et al. (2008) demostró el efecto aditivo al combinar la luz UVC con pulsos eléctricos en zumo de manzana. Reverter-Carrión et al. (2018) al estudiar la combinación de tecnologías (UHPH-UVC), obtuvieron un efecto aditivo en la inactivación de esporas bacterianas y fúngicas en tampón fosfato. Sin embargo, Saucedo-Gálvez et al. (2019), determinaron un efecto sinérgico utilizando la misma matriz con la misma tecnología, al observar que la UHPH provocaba cambios en la pared de las ascosporas fúngicas, lo cual aumentó su susceptibilidad a la radiación UVC.

Un factor importante a tener en cuenta cuando se combinan dos o más tecnologías, es el orden en que estas se aplican. En un estudio realizado por Maktabi et al. (2011) observaron que al combinar la radiación UVC con radiaciones láser y, alternativamente, con microondas o un tratamiento térmico moderado, los resultados de letalidad obtenidos eran diferentes, consiguiendo una mayor letalidad al aplicar en primer lugar la tecnología láser, seguida de la térmica y finalmente la radiación UVC. Finalmente, no solo el orden de aplicación es importante sino también si se aplica de forma secuencial o simultáneamente. Así, Char et al. 2010 demostraron que al aplicar la radiación UVC de manera simultánea a los pulsos eléctricos se conseguían letalidades más elevadas sobre *E. coli* que si se aplicaban secuencialmente.

Tabla 9: Recopilación de algunos estudios que utilizaron la combinación de tecnologías de procesado.

Tecnología 1	Tecnología 2	Microorganismo	Matriz	Efecto	Referencia
UVC	Pulsos eléctricos	<i>E. coli</i>	Zumo de manzana	Se observó un efecto aditivo pero no sinérgico para inactivar <i>E. coli</i> en el jugo de manzana.	Gachovska et al. (2008)
UVC	Ultrasonidos	<i>E.coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Zumo de manzana y naranja	El uso en continuo de ambas tecnologías tenía menor eficacia que si la aplicación era de manera simultanea	Char et al. (2010)
UVC	Láser y microondas o calor	<i>E.coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Suspensión en medio	Los tratamientos de manera combinada mostraron una reducción mayor que de manera individual. El orden de los tratamientos también tuvo una influencia significativa.	Maktabi et al. (2011)
UVC	Calor	Esporas de <i>Bacillus</i> spp.	Buffer	La inactivación UV de <i>Bacillus coagulans</i> aumentó sinérgicamente al aumentar la temperatura de tratamiento de 25 a 60 ° C.	Gayán et al. (2013)
UVC	Calor	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>S. cerevisiae</i>	Zumo de zanahoria y naranja	Ciertas combinaciones de UVC y calor suave (45 y 50 ° C) para el procesamiento de la mezcla de jugo de zanahoria y naranja provocaron efectos sinérgicos en la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>P. fluorescens</i> ATCC 49838, alcanzando hasta 6 reducciones logísticas en la población	Garcia-Carrillo et al. (2017)
UVC	Plasma frío	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis,	Salmón ahumado	Mostraron efecto aditivo sobre la letalidad de los microorganismos pero no ausencia completa de <i>L. monocytogenes</i>	Colejo et al. (2018)
UVC	UHPH	Ascosporas de <i>Talaromyces macrosporus</i> Ascosporas de <i>Neosartorya spinosa</i>	Zumo de manzana	Debido a los cambios en la estructura de la pared celular de las ascosporas se aumenta la susceptibilidad a la radiación UVC, mostrando un efecto sinérgico de estas dos tecnologías.	Sauceda-Gálvez et al. (2019)
UVC	UHPH	Esporas de <i>B. subtilis</i> Esporas <i>G. stearothermophilus</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>A. niger</i>	Tampón	Incremento moderado en la letalidad de <i>B. subtilis</i> . Efecto aditivo	Reverter-Carrión et al. (2018)

II. HIPÓTESIS DE PARTIDA y OBJETIVOS

1. Hipótesis de partida

Como se ha planteado anteriormente, para poder definir bien un tratamiento realizado por radiación UVC, es necesario conocer de manera adecuada las características básicas del reactor. El reactor utilizado en este estudio (Patente nº 2 965 766 B2), permite realizar tratamientos de alimentos líquidos y semiviscosos a temperaturas controladas (2-95 °C). Permite aplicar tratamientos UVC a temperaturas superiores a 50 °C sin que disminuya el rendimiento de la lámpara, debido a la refrigeración constante de esta. El grosor de la capa por la que circula el alimento a tratar es inferior a 1 milímetro, lo que es importante para alimentos con un alto coeficiente de absorción. Además, el reactor es ampliable mediante la unión secuencial o en paralelo de más reactores UVC, pudiendo crear suficientes turbulencias y mezclando los alimentos para asegurar que todo el volumen del alimento sea irradiado.

Para la validación del equipo UVC se han considerado diferentes tipos de alimentos líquidos de pH neutro. Uno de ellos ha sido la leche, que es una de las matrices líquidas de pH neutro más estudiadas dentro del campo de las tecnologías de procesado no térmicas, incluida la UVC. A diferencia de la leche, hay muy pocos estudios en el campo de los tratamientos por luz UVC, dedicados al licuado de soja o al té verde, a pesar de que son alimentos con un consumo cada vez más elevado, por lo que el estudio del efecto de estos tratamientos reviste un gran interés.

Otra característica fundamental de este reactor es que su diseño permite la conexión en continuo con otros equipos. Como consecuencia, se planteó la posibilidad de la unión de dos tecnologías de procesado no térmicas para superar los inconvenientes que cada tecnología tiene de forma individual en relación a la efectividad de la eliminación de los microorganismos, y en este caso se seleccionó la UHPH.

Por un lado, la luz UVC actúa a nivel de genoma y causa daños irreversibles en la replicación de los microorganismos. Sin embargo, cuando se trata de esporas fúngicas, debido a la naturaleza de estas esporas y en concreto de las conidiosporas de *Aspergillus niger* que contienen una gran cantidad de pigmentación (melanina) que les protege de la radiación UVC, los tratamientos no son tan eficientes. En este caso, los fenómenos físicos de letalidad de la UHPH permite alcanzar un mayor grado de inactivación. Además, la acción física de la UHPH permite la estabilización de emulsiones y la reducción considerable del tamaño de

partícula, lo que favorece la estabilidad física de los alimentos líquidos, así como en algunos casos la inactivación de enzimas. Adicionalmente, la combinación de tecnologías de procesado utilizando tratamientos más suaves, puede preservar las características organolépticas y nutricionales de los alimentos para conseguir una mayor aceptabilidad por parte del consumidor. Por lo tanto, se espera que en los tratamientos UHPH, UVC o la combinación de ambos con condiciones de tratamiento más suaves, puedan conseguir un mejor resultado, obteniéndose un mayor efecto, ya sea sinérgico, aditivo o complementario, que el conseguido mediante la aplicación de las tecnologías de manera individualizada.

Por las razones citadas anteriormente, se plantea el estudio del efecto microbicida de tratamientos UVC aplicados en diferentes matrices, así como del efecto combinado de la radiación UVC y de la UHPH, definiendo los parámetros óptimos de su aplicación combinada para lograr resultados equivalentes a los tratamientos de esterilización comercial.

2. Objetivo general

La presente tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto de investigación nacional AGL2014-60005-R del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, titulado “Obtención de alimentos líquidos estériles mediante la aplicación conjunta de UHPH-UVC”, que tiene como objetivo general la obtención de alimentos líquidos inocuos mediante la aplicación combinada de tratamientos UHPH y luz UVC.

3. Objetivos específicos

Determinar la letalidad causada en esporas y células vegetativas de microorganismos de diferentes tratamientos UVC aplicados en matrices alimentarias con distintas propiedades intrínsecas y determinar los parámetros de aplicación que permitan alcanzar la máxima letalidad en los microorganismos ensayados.

Validar las condiciones de tratamiento combinado UHPH-UVC más eficaces, en matrices alimenticias reales inoculadas con los microorganismos más resistentes.

Obtener modelos matemáticos predictivos para determinar la letalidad de los diferentes microorganismos en función de los parámetros aplicados en los tratamientos UVC y de las propiedades de la matriz.

III. PLAN DE TRABAJO

Para poder cumplir con los objetivos anteriormente propuestos, se realizaron tres diseños experimentales según la matriz evaluada: licuado de soja (**Figura 7**), leche entera y leche desnatada (**Figura 8**) y té verde (**Figura 9**).

Inicialmente, se validó el tratamiento por UVC mediante un estudio en el que se combinaron diferentes variables fundamentales para el efecto del tratamiento UVC: la dosis, el caudal/ n° de revoluciones por minuto (RPM), el número de entradas en el túnel (NET) y la temperatura durante el tratamiento. De esta forma se definieron 3 tratamientos básicos (T1, T2, T3; véase sección IV. Material y métodos, punto 5.2.).

Las matrices alimentarias seleccionadas fueron alimentos líquidos de pH neutro, debido a su mayor susceptibilidad en cuanto a un posible crecimiento microbiano posterior al tratamiento. Por ello, las matrices líquidas seleccionadas fueron: 1) té verde, con un coeficiente de absorbancia bajo, 2) leche entera y leche desnatada, con un coeficiente de absorbancia medio, en la que además se determinó el efecto que tienen los glóbulos de grasa (turbidez) en el tratamiento, y 3) bebida de soja, con un coeficiente de absorbancia alto.

En todas las matrices se evaluó la letalidad de las esporas de *Bacillus subtilis*, seleccionado como microorganismo referencia en los tratamientos por UVC, aplicando los 3 tratamientos (T1, T2 y T3). En el licuado de soja y el té verde, se estudió también la letalidad sobre conidiosporas de *Aspergillus niger* y células vegetativas de *Escherichia coli* (bacilo Gram negativo) y *Listeria monocytogenes* (bacilo Gram positivo). En el caso del té verde, se ensayó el efecto de la UVC a diferentes temperaturas (4, 20 y 55 °C) para determinar su posible efecto aditivo o sinérgico en la letalidad de las esporas de *B. subtilis*. También se estudiaron los factores que de cada matriz podían afectar a la penetración de la radiación UVC y por lo tanto de su efectividad.

Los tratamientos UHPH se aplicaron en matrices de cierta complejidad coloidal (leche entera, leche desnatada y licuado de soja). Las condiciones seleccionadas fueron relativamente suaves: 200 MPa a una temperatura de entrada de 60 °C en ambas matrices, y de 100 MPa a la misma temperatura en el licuado de soja.

En el caso de los procesos combinados, se utilizaron todos los tratamientos UHPH mencionados anteriormente, además de aplicar tratamientos UVC específicos para cada matriz. Para el licuado de soja se optó por utilizar el tratamiento T2, considerando que con dicho tratamiento se obtendrían resultados asimilables a una pasteurización, con la intención de que al combinarlo con los de UHPH se obtuvieran resultados asemejables a una esterilización comercial. En el caso de la leche entera y desnatada, el tratamiento combinado se realizó con los tratamientos T1 y T3 para determinar si el efecto de las variables número de pases/caudal/RPM influían al combinarla con la UHPH, así como para determinar el posible efecto de los glóbulos de grasa sobre cada uno de los tratamientos realizados.

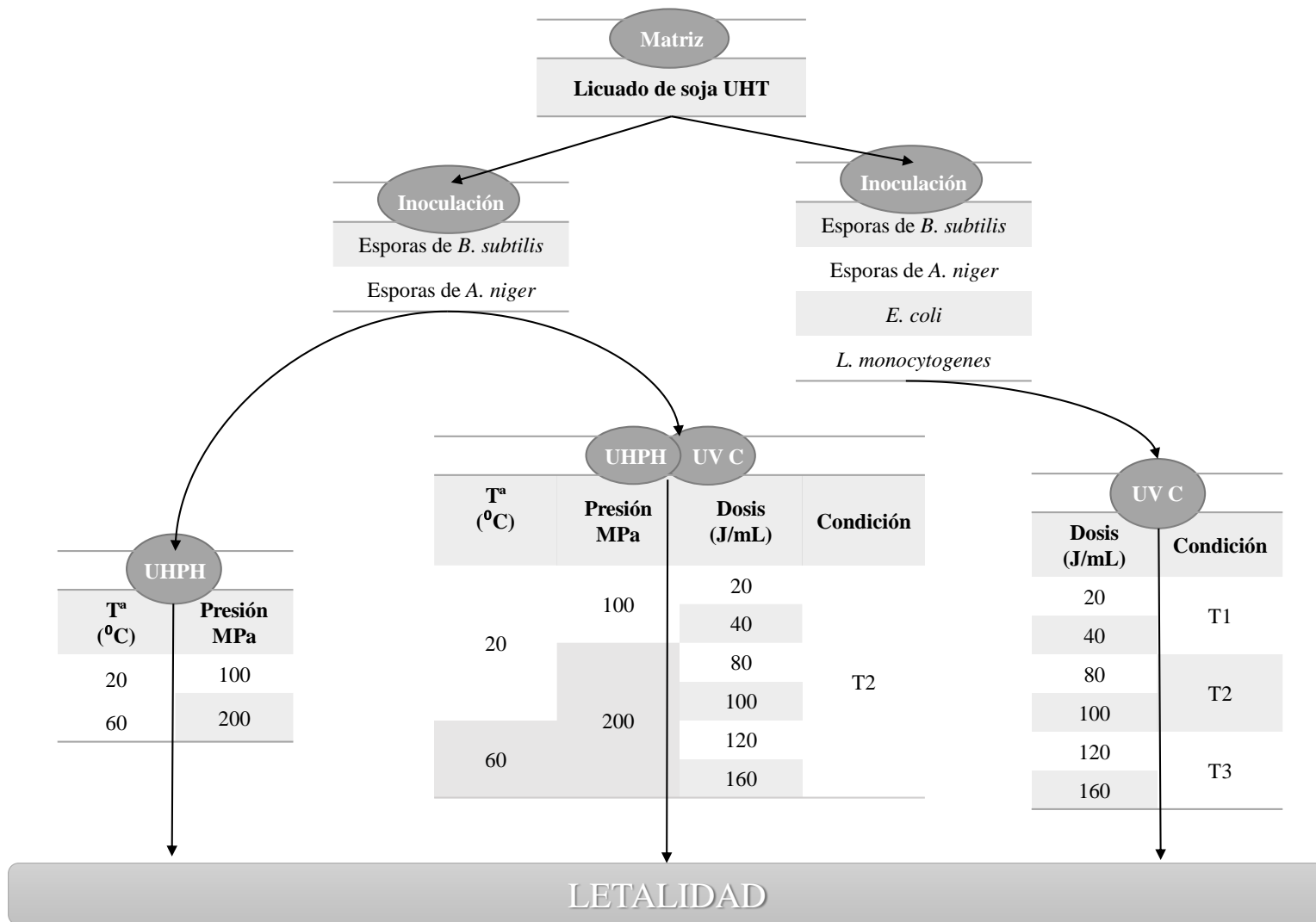


Figura 7: Diseño experimental de todos los tratamientos realizados sobre licuado de soja.

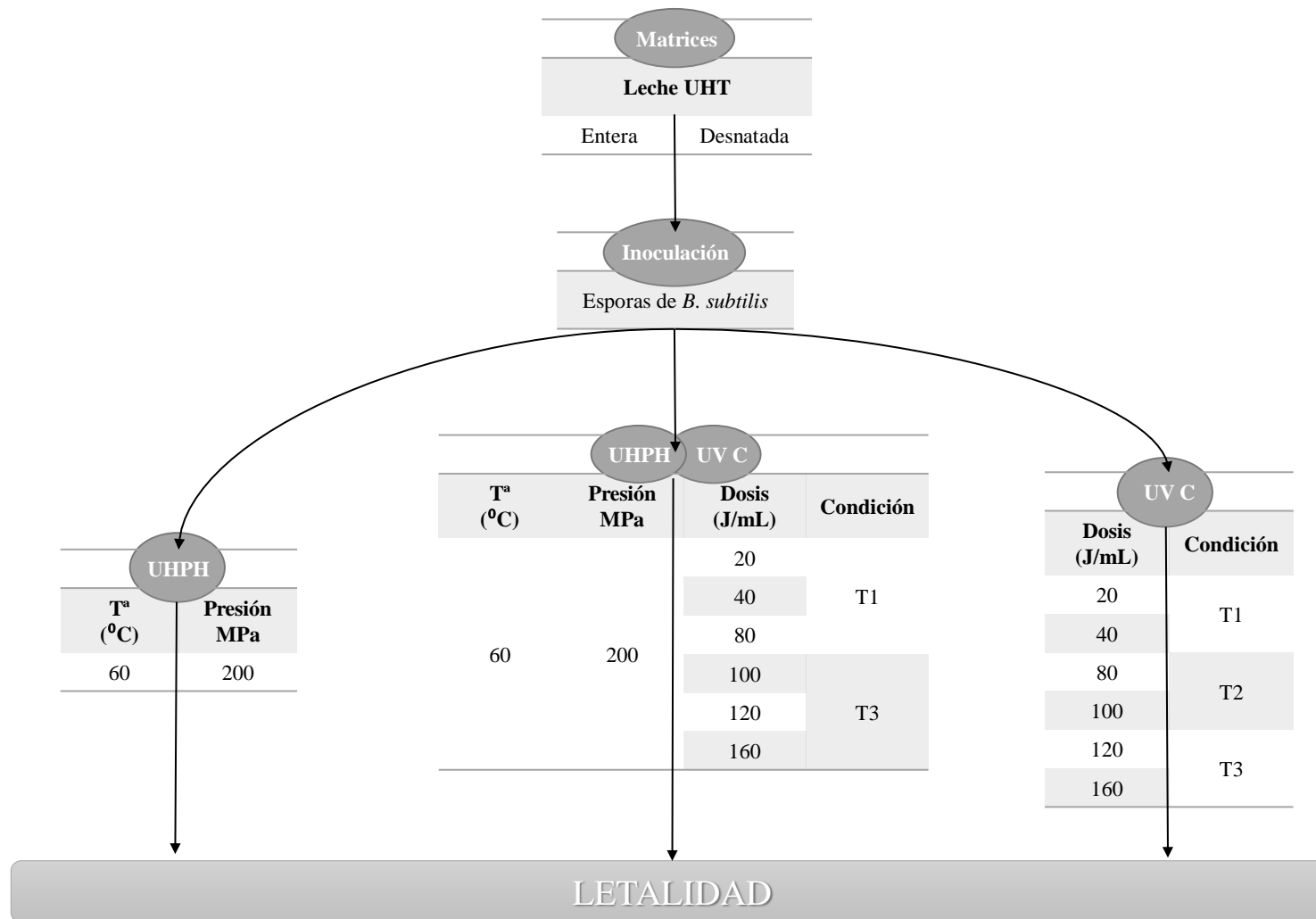


Figura 8: Diseño experimental de todos los tratamientos realizados sobre leche entera y leche desnatada.

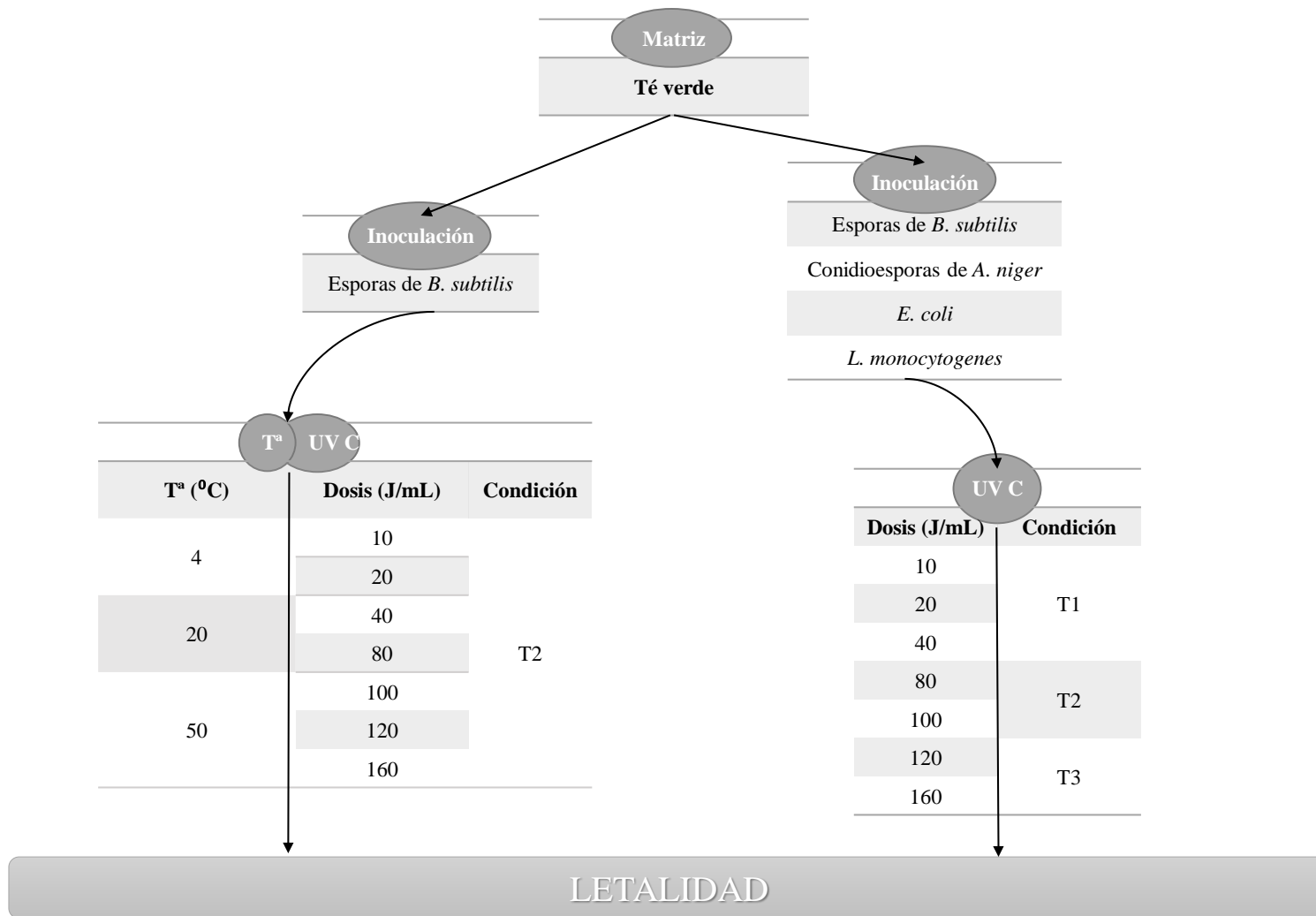


Figura 9: Diseño experimental de todos los tratamientos realizados sobre té verde.

IV. MATERIAL y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados en este estudio

Los microorganismos utilizados en el presente estudio fueron: *E. coli* CECT 423, *L. monocytogenes* CECT 4031, *B. subtilis* CECT 4002 y *A. niger* CECT 2574. Todos ellos se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Valencia, España).

1.1. Recuperación y preparación de inóculos

1.1.1 Conidiosporas de A. niger

El liofilizado de *A. niger* se rehidrató en 9 mL de caldo de triptona y soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), y se incubó a 30 °C durante 24 h. Del cultivo obtenido se sembraron placas de Petri que contenían agar con dextrosa de patata (PDA, Oxoid) y se incubaron a 30 °C durante 7 días. Después de la incubación, se agregaron 3 mL de caldo nutritivo (NB, Oxoid) directamente sobre el cultivo de la placa de Petri, raspando la superficie del cultivo con un asa de Digrafsky. A la suspensión obtenida, se le añadieron 9 mL de caldo NB (Oxoid) y se dejó incubar a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, se inoculó un tubo de NB (Oxoid) con 1 mL de la suspensión de esporas y se dejó incubar a 30 °C durante 48 h. Posteriormente, se transfirieron 2 mL de este cultivo a frascos de Roux que contenían agar con extracto de malta [MEA: 30 g de extracto de malta (Biolife, Milán, Italia), 3 g de peptona de carne (Conda, Madrid, España) y 15 g de agar (Oxoid) en 1 L de agua destilada] y se incubaron a 30 °C hasta alcanzar la tasa máxima de esporulación, lo que sucedía tras aproximadamente 15 días.

La recuperación de las conidiosporas de *A. niger* se realizó en base al procedimiento descrito en la norma UNE-EN 1650: 2008 (AENOR, 2008) con algunas modificaciones. Se utilizó 20 mL de Tween 80 (Scharlab, S.L., Sentmenat, España) estéril al 0,05% (v/v) para recoger las conidiosporas de los frascos de Roux con ayuda de un asa Digrafsky. Posteriormente, se sometió la suspensión a la acción de ultrasonidos con una frecuencia de 40 kHz (Branson 2510, Ultrasonics, Danbury, Estados Unidos) durante 10 min, tras lo que se filtró con un embudo Büchner estéril con un poro de 0,44 µm (Labbox, Mataró, España), colmatado con

lana de vidrio estéril (Panreac, Castellar del Vallés, España). Finalmente, la suspensión filtrada se recogió en un tubo estéril para ser utilizada el mismo día del tratamiento.

Para asegurar que se disponía de un número suficiente de conidiosporas (al menos 10^9 /mL) se realizó su recuento mezclando 10 μ L de la suspensión con 10 μ L de colorante Trypan Blue Stain (ThermoFisher Scientific, Whaltam, Estados Unidos), utilizando una cámara Bürker (BlauBrand, Alemania) y un microscopio óptico (ML 2000, Euromex, Arnhem, Holanda) a 40x aumentos.

1.1.2 Esporas de *B. subtilis*

La esporulación de *B. subtilis* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la norma EN-13704: 2002 (AENOR, 2002) con modificaciones. Para ello se rehidrató el cultivo liofilizado en 10 mL de caldo de glucosa y triptona [TGB: 2,5 g de extracto de levadura (Oxoid), 5 g de triptona (Oxoid), 1 g de glucosa (Sigma -Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en 1 L de agua destilada y pH ajustado a 7,2], y se incubó durante 24 horas a 30 °C. Posteriormente, se transfirieron 2 mL del cultivo a diversos frascos de Roux con agar de extracto de levadura [MYA: 10 g de extracto de carne (Oxoid), 2 g de extracto de levadura (Oxoid), 15 g de agar (Oxoid) y 0,04 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Merck, Darmstadt, Alemania) en 1 L de agua destilada], que se incubaron a 30 °C durante 30 días, para poder alcanzar concentraciones de esporas muy elevadas. A continuación, se recolectaron las esporas agregando 20 mL de agua destilada estéril al frasco de Roux, raspando la superficie con la ayuda de un asa Digrafsky. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4 °C, utilizando una centrífuga Sigma 4K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Alemania). El sedimento obtenido se resuspendió con 15 mL de agua destilada estéril, realizando en tres ocasiones sucesivos lavados en las mismas condiciones de centrifugación. El sedimento resultante se resuspendió en 30 mL de agua destilada estéril y se sometió a un tratamiento térmico a 75 °C durante 10 min para asegurar la eliminación de las células vegetativas. La suspensión de esporas resultante se almacenó a 4 °C hasta su uso.

1.1.3. Células vegetativas de *E. coli* y *L. monocytogenes*

Se procedió a la recuperación de ambos microorganismos siguiendo las indicaciones del protocolo de recuperación de liófilios de la CECT (CECT, 2019). A continuación, se elaboró una crioteca para la conservación de las cepas. A partir de un cultivo puro de los microorganismos obtenido en medio nutritivo sólido de Agar de Triptona y Soja (TSA, Oxoid), se transfirió una colonia aislada al tubo conteniendo esferas pososas (criobolas) y un medio crioprotector (Microkit, Madrid, España). El tubo se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se dejó reposar durante otro minuto más. A continuación, se retiró el líquido sobrante con una pipeta Pasteur estéril. Los viales de la crioteca se conservaron congelados a -18 ± 2 °C hasta su uso.

Para recuperar los microorganismos de las criotecas, las criobolas se suspendieron en caldo TSB (Oxoid) y se incubaron 18 - 24h a 37 °C, tras lo que se procedió a sembrar placas de Petri con TSA (Oxoid), que se incubaron durante 18 - 24h a 37 °C. Posteriormente se realizó la suspensión de algunas colonias en una solución salina al 0,9%, hasta obtener una suspensión de densidad 1,0 y 1,5 de la escala McFarland para *L. monocytogenes* y *E. coli*, respectivamente, con un densitómetro (Densimat, Biomérieux, Crappone, Francia). Estos valores corresponden a una concentración de aproximadamente 10^8 UFC/mL. La suspensión se preparó el mismo día del tratamiento.

2. Origen y preparación de las matrices utilizadas

Para poder realizar un estudio lo más completo posible del efecto de los tratamientos UVC y su combinación con la UHPH, se seleccionaron matrices alimentarias líquidas de diferentes características interferentes a la penetración de la radiación UVC, y por tanto, a su efectividad. En base a esto, las matrices escogidas para el estudio fueron: leche de vaca entera y desnatada, para determinar el efecto de los glóbulos de grasa, con un coeficiente de absorción alto (en la leche entera) y medio-bajo (en la leche desnatada); licuado de soja, con un coeficiente de absorción medio-alto, y finalmente té verde, con un coeficiente de absorción bajo.

2.1. Preparación del té verde

La matriz utilizada en los ensayos tanto microbiológicos fue una preparación basada en bolsas comerciales de infusión de té verde (Pompadour Ibérica S.A., Alicante, España). Se llevó a ebullición agua descalcificada con un hervidor de ebullición rápido HI-35 (Saivod, Zorlu Group, Estambul, Turquía) y se vertió 1 L en un recipiente de cristal Pyrex previamente esterilizado que contenía 5 bolsitas de té (1,5 g por 200 mL). El contenido se infundió durante 3 min a 80 ± 3 °C. Una vez finalizado el tiempo de infundido, las bolsas se retiraron de la botella y el matraz se enfrió en un baño de agua fría hasta que el contenido alcanzó la temperatura ambiente. La infusión se utilizó el mismo día del tratamiento.

2.2. Leche entera y leche desnatada

Para todos los análisis microbiológicos, la leche entera que se utilizó fue comercial esterilizada mediante UHT y con un contenido de materia grasa del 3,5 %. Por el otro lado, la leche desnatada también fue comercial esterilizada mediante UHT y con un 0,2 % de materia grasa.

2.3. Licuado de soja

Para la inoculación con los cultivos de microorganismos se utilizó un licuado de soja comercial ecológico, esterilizado mediante un procedimiento UHT con un contenido en soja del 14%.

3. Procedimiento de inoculación de las muestras

Se inocularon, por separado, 10 mL de las suspensiones de *E. coli* o *L. monocytogenes*, o 1 mL de la de *B. subtilis* o *A. niger* en cada 1 L de té verde o licuado de soja. En el caso de la leche entera y la leche desnatada, se inoculó sólo 1 mL de *B. subtilis* en 1 L de cada matriz. El volumen inoculado garantizó una concentración inicial mínima de 10^5 UFC/mL.

4. Análisis microbiológico de las muestras

De cada muestra se realizó un banco de diluciones con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) consistente en 0,24 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua destilada y pH ajustado a 7,4 (Panreac). El recuento se realizó por duplicado en los medios de cultivo específicos para cada

microorganismo: Brilliance™ E. coli/coliformes (Oxoid), para *E. coli*; ALOA® (Biomérieux, Cornellà de Llobregat, España) para *L. monocytogenes*; y Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid) para *A. niger*. En el caso de *B. subtilis* se utilizó el medio TSA enriquecido con un 0,6% de extracto de levadura (Oxoid). Posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C para el recuento de *E. coli* y *B. subtilis*, 48 horas a 37°C para el recuento de *L. monocytogenes* y 48 horas a 30 °C para el recuento de *A. niger*.

Transcurrido el período de incubación correspondiente, se procedió al recuento de las colonias características en cada medio. Para calcular la letalidad producida por cada uno de los tratamientos se utilizó la siguiente **Ecuación 3**.

$$\text{Letalidad} = \text{Log}_{10} \left(\frac{N_0}{N + 1} \right) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde: N_0 es el número inicial de colonias presentes en las muestras antes de los tratamientos, expresadas en UFC/mL y N es el número de colonias después de someter las muestras a los tratamientos con radiación UVC, UHPH o la combinación ambas tecnologías, expresado en UFC/mL.

5. Aplicación de los tratamientos con radiación ultravioleta de onda corta (UVC)

5.1. Características del reactor UVC

Se utilizó un reactor UVC (UV-Therm, Ypsicon S.L., Barcelona, España; Patente Europea nº 2 965 766 B2). Las características básicas del reactor se presentan en la **Tabla 10**. Este reactor está compuesto por un depósito de 5 L de capacidad que alimenta el circuito mediante una bomba peristáltica Flowmaster FMT300 (ISMATEC Lab. GmbH, Wertheim-Mondfeld, Alemania). La bomba es capaz de regular el flujo de circulación del fluido, y en consecuencia, el tiempo que el fluido permanecerá en el reactor UVC. La muestra circula desde el depósito al reactor UVC a través de un tubo de silicona. El reactor tiene una capacidad de 673 mL de volumen total y consta de dos lámparas UVC de mercurio de baja presión (UV-Consulting Peschl España, Castellón, España), con una potencia eléctrica total de 55 W y una irradiancia de 41 mW/cm². Cada una de las lámparas está protegida por con un tubo de cuarzo (UV-Consulting Peschl España) de 2 mm de grosor, dejando un espacio radial para que circule el alimento de aproximadamente 1 mm.

La sección interna del reactor UVC consta de diferentes cilindros concéntricos (**Figura 10**): entre las secciones A y B circula aire para refrigerar la lámpara UVC; entre las secciones B y C circula la matriz alimentaria (1 mm de ancho), y en el último cilindro concéntrico (entre secciones C y D) circula agua procedente del baño termostático (PolyScience, Illinois, USA) para poder controlar la temperatura a la que se realizan los tratamientos UVC.

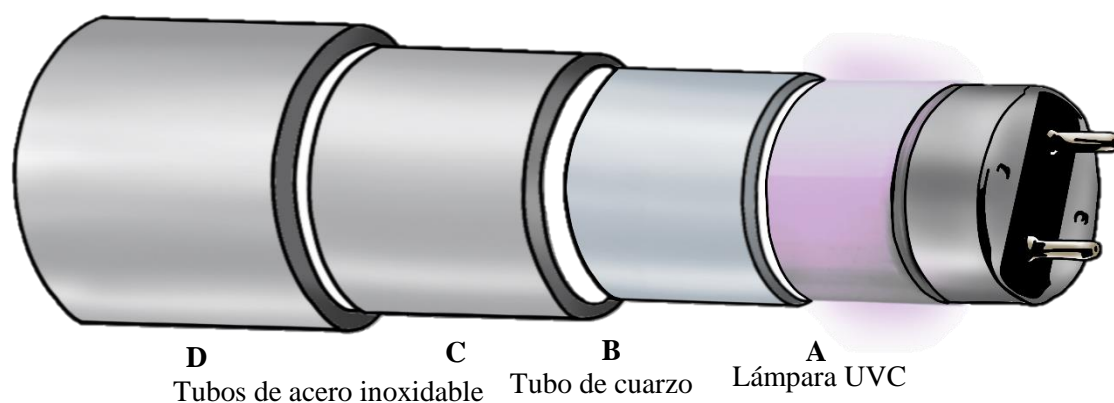


Figura 10: Esquema de la sección interna de una de las lámparas del reactor UVC.

Tabla 10: Características técnicas del reactor UVC

R1	Radio exterior del cilindro (cuarzo)	14	mm
R2	Radio interior del cilindro (acero inoxidable)	15	mm
d	Espacio de separación entre los cilindros (matriz)	1	mm
V	Volumen tratado	70	mL
S	Superficie de la lámpara	673	cm ²
L	Longitud lámpara	765	mm
P	Potencia eléctrica de entrada a la lámpara	55	W
W	Potencia UVC total emitida	27,6	W
I₀	Irradiancia UVC emitida	41	mW/cm ²
U_v	Caudal utilizado	0,5-3,88	L/h
Ω	RPM utilizadas	5-500	RPM
L	nº de lámparas	2	

5.2 Tratamientos de UVC aplicados a las muestras

En la **Tabla 11** se muestra las condiciones de tratamiento (dosis UVC, caudal, tiempo de exposición y temperatura) aplicadas a cada matriz. Una vez tratadas, las muestras se

recogieron asépticamente en una cabina de bioseguridad Telstar PCR Mini-V (Telstar, Terrassa, España), en envases estériles, que se conservaron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

Tabla 11: Condiciones de aplicación de los tratamientos UVC.

Tratamientos	Dosis (J/mL)	Caudal (mL/s)	RPM	Tiempo (s)	Temperatura de tratamiento (°C)
Desglose tratamiento 1 (T1)	10	5,83	43	12	4 20 55
	20	2,92	21	24	
	40	1,46	12	48	
	80	0,73	6	96	
	100	0,58	5	120	
	120	0,47	3	144	
	160	0,27	1,5	192	
Desglose tratamiento 2 (T2)	10	41,87	300	180	20
	20			360	
	40			720	
	80			1440	
	100			1800	
	120			2160	
	160			2880	
Desglose tratamiento 3 (T3)	10	64,60	500	180	20
	20			360	
	40			720	
	80			1440	
	100			1800	
	120			2160	
	160			2880	

5.3. Cálculo de la dosis de los tratamientos realizados

Para la dosis que recibe la matriz para cada uno de los tratamientos realizados se utilizó la siguiente ecuación (**Ecuación 4**).

$$E = I \cdot t \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde E corresponde a la dosis UV que ha recibido la matriz, expresada en $\frac{J}{cm^2}$; I corresponde a la intensidad que recibe la matriz, expresada en $\frac{W}{cm^2}$ y t es el tiempo, expresado en segundos, de exposición de la matriz alimentaria a la fuente de radiación.

5.4. Determinación de la intensidad recibida en las matrices

Para poder calcular la intensidad que reciben las matrices estudiadas durante el tratamiento se utilizó la Ley de Lamber-Beer (**Ecuación 5**).

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot c \cdot d} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde I y I_0 corresponden a la intensidad de la UVC expresada en mW/cm^2 ; I corresponde a la intensidad que recibe la matriz en un punto determinado y I_0 corresponde a la intensidad que emite el reactor. La constante k corresponde al coeficiente molar o coeficiente de absorción del alimento líquido, expresado en $L/mol/cm$, c es la concentración de solutos de la muestra con capacidad de absorber intensidad de luz UVC expresada en mol/L , y finalmente d es la profundidad o distancia conseguida o que ha de atravesar la luz UVC, expresada en cm .

5.5. Determinación del grado de turbulencia del flujo

Para determinar el tipo de flujo con el que circuló la matriz por el reactor (en concreto cuando pasó por la lámpara con un espacio de 1 mm), se procedió a la medición del número de Reynolds (Re), según la fórmula descrita por Burton (1951) (**Ecuación 6**).

$$Re = \frac{D \cdot v \cdot \rho}{\mu} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde D es el diámetro del tubo (m) o diámetro equivalente en el caso de tubos con secciones no circulares, v es la velocidad promedio de flujo (m/s), ρ es la densidad del fluido (kg/m^3) y

μ es la viscosidad del fluido expresada en Pa·s o kg/(m·s).

Para poder calcular el diámetro interno equivalente del reactor UVC se utilizó la fórmula de la geometría anular simplificada llamada “*Narrow Slot Approximation*” (Ozbayoglu y Omurlu 2006) (**Ecuación 7**) para fluidos newtonianos.

$$d_e = 0,816(d_2 - d_1) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde el diámetro equivalente d_e corresponde a una constante (0,816), d_1 es el diámetro exterior y d_2 el diámetro interior del cilindro del reactor UVC.

Una vez aplicada la fórmula de Burton (**Ecuación 6**), el flujo se considera laminar cuando el valor de Re es menor que 2100, mientras que un valor de Re por encima de 4000 indica una condición de flujo turbulento.

5.6. Cálculo de la dosis UVC e irradiancia de los tratamientos

Para poder calcular la energía emitida por la lámpara UVC por unidad de superficie se realizó una radiometría, mientras que para poder realizar el mismo cálculo pero por unidad de volumen se realizó una actinometría.

5.6.1. Radiometría

La irradiancia (mW/cm²) de la lámpara se midió utilizando un radiómetro de mano UVM-CP y un sensor calibrado 90155 (UV-Consulting Peschl®, Mainz, Alemania).

5.6.2. Actinometría

La actinometría permite calcular la cantidad de radiación UVC incidente sobre un volumen de reactivo a través de una reacción fotoquímica. Para su medición se procedió según la metodología descrita por Rahn (1997), según la cual los compuestos resultantes de la foto-reacción pueden determinarse analíticamente. La solución elegida para realizar esta reacción fue una solución de yoduro/yodato. Para poder elaborar la solución de yoduro de potasio se utilizó 0,0010 M de borato de sodio (Na₂B₄O₇ · 10H₂O, Panreac) con 0,1 M de iodato de potasio (KIO₃, Panreac). A continuación se aforó hasta 1 L la solución anterior con una solución 0,6 M de yoduro de potasio (KI, Panreac).

La solución de yoduro de potasio se pasó a través del reactor UVC, recolectando las muestras después de cada uno de los tratamientos. A continuación, se midió su absorbancia a una

longitud de onda de 352 nm, usando un espectrofotómetro Nanophotometer Pearl (IMPLEN, Munich, Alemania). Las muestras tratadas se diluyeron 10 veces con agua destilada.

Para poder calcular la potencia de las lámparas del reactor de UVC se utilizó la fórmula matemática propuesta por Bolton y Linden (2003) (**Ecuación 8**).

$$H_{MP} = \frac{(\Delta OD_{352})(V)(23.786,4)}{(I)(1 + 0,02(T - 20,7))A} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

H_{MP} = Dosis de UV aplicada de la lámpara de UV en mJ/cm^2

ΔOD_{352} = Absorbancia de la muestra irradiada o de la muestra sin tratar (blanco) medida a 352 nm

V = Volumen de la muestra irradiada en L (0,07 L)

I = Paso de la luz por la solución en cm (en el reactor utilizado era de 0,1 cm)

T = Temperatura del tratamiento, expresado en °C

A = Área de la muestra tratada por la radiación UVC (700 cm^2)

23.786,4: Constante (mJ/cm^2) utilizada tomando en cuenta la ganancia cuántica, el coeficiente de absorción molar y el factor de conversión de Einsteins, específica para las lámparas LPM-UV.

6. Aplicación de los tratamientos de homogenización a presión ultra- alta (UHPH)

Para este propósito, se utilizó un homogeneizador de presión ultra-alta modelo Stansted FPG12500 (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido) con un caudal de 15 L/h. El equipo dispone de dos intensificadores que están impulsados por una bomba hidráulica y el sistema de alimentación de los intensificadores (pistones) se realiza mediante una bomba de membrana. El producto pasa por una válvula de presión, consistente en una combinación de aguja y un asiento de circonio, con un ángulo de corte de $60 \pm 0,5^\circ$ en la aguja y de $45 \pm 0,5^\circ$ en el asiento, que permiten alcanzar presiones de hasta 350 MPa. Para minimizar el efecto térmico, se emplazaron dos intercambiadores de calor en espiral (Garvía, Barcelona, España) antes y después de la válvula de presión. Durante los tratamientos se determinaron las

temperatura alcanzada en la matriz en diferentes puntos clave del equipo: en el tanque de alimentación (T^a_0), antes del paso por la válvula UHPH (T^a_{in}), inmediatamente después de la válvula UHPH (T^a_{va}) y la temperatura de salida del producto (T^a_{fi}).

Dependiendo de las matrices utilizadas y los microorganismos inoculados, los tratamientos de UHPH aplicados fueron diferentes: (1) El licuado de soja inoculado con esporas de *B. subtilis* o conidiosporas de *A. niger* se trató a 100 y 200 MPa en una sola etapa, con temperaturas de entrada (T^a_{in}) de 20 y 60 °C para cada nivel de presión (2) la leche entera y la leche desnatada inoculadas con esporas de *B. subtilis* se trataron a una presión de 200 MPa en una sola etapa, con una T^a_{in} de 20 °C.

Todas las muestras tratadas fueron recogidas en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar Telstar PCR Mini-V (Telstar).

7. Combinación de tratamientos UHPH y UVC

Las mismas matrices tratadas por UHPH también lo fueron en combinación con UVC para evaluar un posible efecto sinérgico o aditivo de ambas tecnologías. En el caso del licuado de soja, tras el tratamiento UHPH a 100 y 200 MPa a 20 y 60 °C, se le aplicó las condiciones de tratamiento T2 de radiación UVC. En el caso de la leche entera y la desnatada, el tratamiento aplicado por UHPH fue de 200 MPa a 20 °C, para posteriormente aplicar las condiciones de tratamiento se sometieron a las condiciones de tratamiento T1 y T3 por UVC.

8. Limpieza y desinfección de los equipos

Antes de cada tratamiento, todos los equipos se desinfectaron haciendo recircular una solución de hipoclorito de sodio al 0,1% (40 g/L de cloro libre) durante 10 min a 20 °C. A continuación, se hizo circular 10 L de agua descalcificada estéril, para eliminar completamente cualquier residuo de desinfectante. Después de los tratamientos, el circuito se limpió recirculando una solución de jabón alcalino no espumoso Capture-VC16 (Diversey España, Viladecans, España) a 60 °C durante 15 min, para eliminar los restos de matriz alimentaria. A continuación, se circularon 10 L de agua para enjuagar los restos de jabón y, a continuación el circuito se desinfectó circulando una solución al 0,1% de hipoclorito de sodio durante 10 min, a 20 °C. Finalmente, los restos de desinfectante se aclararon bombeando 10 L

de agua descalcificada estéril. Se recogió una muestra del agua de enjuague de cada equipo y se analizó microbiológicamente antes de cada tratamiento, para asegurar que los equipos empleados durante los tratamientos no aportaran contaminación.

9. Caracterización de las matrices

Antes de realizar los tratamientos UVC, UPH y la combinación, se realizaron diferentes análisis fisicoquímicos de caracterización de las matrices con la finalidad de determinar su influencia en la respuesta de la letalidad.

9.1. Absorbancia a 254 nm y espectro de absorción

Tanto el coeficiente de absorción (a 254 nm) como el espectro de absorción (200 a 800 nm) de todas las matrices evaluadas en este estudio se midió con un espectrofotómetro modelo Nanophotometer Pearl (IMPLEN GmbH, München, Alemania) con cubetas de cuarzo de 10 mm (Fisher Scientific, Hanover, Illinois, EE. UU.). Para que las absorbancias entraran dentro del rango fiable de lectura del espectrofotómetro se realizaron diferentes diluciones. En el caso del té verde, para calcular el coeficiente de absorción se realizó una dilución en agua destilada 1/100, mientras que para realizar su espectro de absorción fue de 1/1000. En el resto de matrices alimentarias para ambos parámetros la dilución en agua destilada fue de 1/1000.

9.2. Turbidez

La turbidez de todas las muestras se midió con un turbidímetro portátil modelo (EPA) 2100Q (HACH, Hospitalet de Llobregat, España). En el caso del té verde la lectura fue directa, pero en la leche entera, leche desnatada y el licuado de soja se realizó una dilución 1/1000 en agua destilada. Las unidades se expresaron como unidades NTU (Unidad Nefelométrica de Turbidez).

9.3. pH

El pH de las matrices se midió directamente utilizando un medidor de H modelo pH básico-20 (Crison, Barcelona, España) con una temperatura del producto de 20 °C.

9.4. Viscosidad

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro modelo Ostwald 1293 (CIVEQ, Ciudad de México, México). Se calculó midiendo del tiempo que tarda la matriz analizada en

recorrer dos puntos marcados. Todos los análisis se realizaron a 24 °C. La fórmula utilizada para calcular la viscosidad relativa final fue la siguiente (**Ecuación 9**).

$$\mu' = \mu \cdot \frac{\rho' \cdot t'}{\rho \cdot t} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde μ' representa la viscosidad relativa de la matriz evaluada, expresada en Pascales por segundo (Pa·s), μ es la viscosidad relativa al agua, expresada en Pa·s. En la fracción, ρ es densidad del agua de la expresada en g/mL y t el tiempo que tarda ésta en recorrer las dos marcas estipuladas en el viscosímetro. En el denominador de la fracción, ρ' es la densidad de matriz evaluada multiplicada por el tiempo t' que tarda la matriz en recorrer todo el circuito del viscosímetro. Todos los parámetros de la matriz evaluada y del agua, en la ecuación se igualan frente a la misma temperatura de medición, en nuestro caso a 24 °C.

9.5. Densidad

La densidad de todas las matrices se determinó con un densímetro comercial hidrómetro-aerómetro, modelo HYDR-100-001 (Labbox) y las unidades se obtuvieron mediante la siguiente relación (**Ecuación 10**).

$$\rho = \frac{m}{v} \quad \text{Ecuación 10}$$

Dónde ρ representa la densidad expresada en g/mL, m es la masa expresada en gramos y v el volumen expresado en mL.

10. Análisis de los datos y obtención de modelos estadísticos

10.1. Análisis estadístico

De cada experimento se realizaron un mínimo tres ensayos independientes. Cada una de las muestras obtenidas en cada ensayo se analizó por duplicado ($n \geq 6$). Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de la variancia (ANOVA), con un contraste *a posteriori* mediante el test de Tukey, para la comparación entre las cuatro matrices empleadas así como también para cada uno de los tratamientos realizados y microorganismos inoculados. El análisis se realizó mediante el sistema de análisis de datos STATISTICA versión 7 (StatSoft, Inc., 2004, California, Estados Unidos). Se estableció una $p < 0,05$ para considerar un nivel estadísticamente significativo.

10.2. Modelos estadísticos

Se realizó la modelización estadística de los resultados obtenidos con las diferentes matrices y microorganismos después de los tratamientos UVC (T1, T2 y T3). De esta manera, se obtuvieron diferentes modelos que constan de una variable respuesta, la letalidad, y diferentes variables explicativas o independientes: (1) Log_c correspondiente a cantidad de microorganismos inoculados, expresados en $\log \text{UFC/mL}$, (2) UVC, la dosis de radiación UVC, expresada en J/mL , (3) caudal del tratamiento, expresado en mL/s y (4) NET o número de pases en valor absoluto.

En los cinco modelos obtenido la variable Log_c se combina con diferentes variables explicativas. En el caso del modelo 1 presenta la combinación de las variables dosis y caudal con un ajuste lineal; en el modelo 2, solo se tiene en cuenta el valor NET o número de pases, con un ajuste lineal; el modelo 3 se ajusta cuadráticamente el número de pases o valor NET; el modelo 4, las variables utilizadas son la dosis, el caudal y el valor NET con un ajuste lineal y finalmente el modelo 5, ajusta cuadráticamente las variables dosis, caudal y valor NET.

Además, se realizó un análisis de la varianza mediante un ANOVA para determinar el efecto de las diferentes matrices en la letalidad obtenida por los tratamientos UVC de esporas de *B. subtilis* comparandolas 2 a 2. Los p-valores obtenidos se corrigieron mediante la corrección de Tukey.

Todos los modelos estadísticos utilizados se realizaron en el Servei d'Estadística Aplicada de la UAB con el software SAS v9.4, Institute Inc., Cary, NC, USA. Las decisiones estadísticas se realizaron tomando en cuenta un nivel de significación el valor $p < 0,05$.

10.3. Cinéticas de inactivación y cálculo del valor D_{uvc} y $4D$

Para determinar las curvas de inactivación de los diferentes tratamientos UVC (T1, T2 Y T3) se utilizó el software de libre distribución GInaFiT, desarrollado en la Universidad Católica de Lovaina, y que utiliza Microsoft © Excel como soporte. Con este software se obtuvieron diferentes curvas de supervivencia lineales y no lineales a través de los diferentes modelos disponibles: bifásico (Cerf, 1977), Weibull (Mafart et al. 2001), Weibull con cola (Albert y Mafart, 2005), Doble Weibull (Coroller et al. 2006) y modelos bifásicos con hombro (Geeraerd, Valdramidis y Van Impe, 2005). El software GInaFiT proporciona los valores

necesarios para determinar la idoneidad de ajuste del modelo. Utilizando el valor de RMSE más pequeño y un coeficiente de correlación (R^2) más elevado, se obtienen las curvas que presenten una cinética de inactivación con el mejor ajuste.

Además de obtener modelos lineales-logarítmicos, con el programa GInaFiT se obtienen estimaciones de parámetros que pueden proporcionar información sobre los mecanismos destructivos, resistencia al estrés, concentración celular residual, eficiencia del tratamiento, entre otros. Uno de los parámetros proporcionados es el valor 4D, que es la dosis necesaria para reducir 4 log de cada uno de los microorganismos testados en las matrices utilizadas. Este parámetro aplica tanto a curvas lineales-logarítmicas como a las no lineales (Buchanan et al. 1993), mientras que el valor D_{uvc} solo es aplicable a los modelos lineales logarítmicos.

Las ecuaciones utilizadas para poder realizar los diferentes modelos se detallan a continuación:

Modelo bifásico (Cerf, 1977) (**Ecuación 11**):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) + \log_{10} (f * e^{-k_{max1}t} + (1 - f) * e^{-k_{max2}t}) \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

N_0 es la concentración del inóculo inicial;

t es el tiempo;

f es la fracción de la población inicial en una subpoblación mayor;

$(1-f)$ es la fracción de la población inicial en una subpoblación menor y

k_{max1} y k_{max2} son las tasas específicas de inactivación de las dos poblaciones, respectivamente.

Modelo lineal (Bigelow y Etsy, 1920) (**Ecuación 12**):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) - \left(\frac{k_{max} * t}{\ln(10)} \right) \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde:

N es la densidad celular microbiana;

N_0 es la concentración del inóculo inicial;

t es el tiempo;

k_{max} es la constante de inactivación de primer orden y

$Ln(10)$ representa el tiempo de reducción decimal.

Modelo lineal logarítmico con cola (Geeraerd, Herremans y Van Impe, 2000) (**Ecuación 13**):

$$\log N = \log 10 \left((10^{\log N_0} - 10^{\log N_{res}}) - e^{(k_{max} t)} + 10^{\log N_{res}} \right) \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

N representa la densidad celular microbiana;

N_0 es la concentración del inóculo inicial;

N_{res} es el número de subpoblación de bacterias resistentes;

t es el tiempo y

k_{max} es la tasa de inactivación de la parte logarítmica lineal de la curva.

Modelo lineal logarítmico con hombro (Geeraerd et al. 2000, 2005) (**Ecuación 14**):

$$N = \frac{N_0 * e^{(-k_{max} * t)} * e^{(k_{max} * SI)}}{(1 + (e^{(k_{max} * SI)} - 1)) * e^{(-k_{max} * t)}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde:

N_0 concentración del inóculo inicial;

t tiempo;

k_{max} es la tasa de inactivación y

SI son los grados de libertad utilizados para la estimación de parámetros por GInaFiT.

Modelo lineal logarítmico con hombro y cola (Geeraerd et al. 2000, 2005) (**Ecuación 15**):

$$\log_{10}(N) = \log_{10} \left(\frac{((10^{\log_{10}(N(0))} - 10^{\log_{10}(N_{res})}) * e^{(-k_{max} * t)} * e^{(k_{max} * SI)})}{(1 + (e^{(k_{max} * SI)} - 1)) * e^{(-k_{max} * t)}} \right) + 10^{\log_{10}(N_{res})} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde:

N_0 concentración del inóculo inicial;

N_{res} el número de subpoblaciones de bacterias resistentes,

t tiempo;

k_{max} es la tasa de inactivación y

SI son los grados de libertad utilizados para la estimación de parámetros por GInaFiT.

Modelo bifásico con hombro (Geeraerd et al. 2005) (**Ecuación 16**):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) + \log_{10} \left(\frac{f \cdot \exp(-k_{max1} \cdot t) \cdot \frac{\exp(k_{max1} \cdot SI)}{1 + (\exp(k_{max1} \cdot SI) - 1) \cdot \exp(-k_{max1} \cdot t)} + (1-f) \cdot \exp(-k_{max2} \cdot t) \cdot \frac{\exp(k_{max1} \cdot SI)}{(1 + (\exp(k_{max1} \cdot SI) - 1) \cdot \exp(-k_{max1} \cdot t))^{\frac{k_{max2}}{k_{max1}}}}}{1 + (\exp(k_{max1} \cdot SI) - 1) \cdot \exp(-k_{max1} \cdot t)} \right) \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde:

N_0 es la concentración bacteriana inicial;

t es el tiempo;

k_{max1} y k_{max2} son las tasas de inactivación específicas de las dos poblaciones y

SI = son los grados de libertad utilizados para la estimación de parámetros por GInaFiT.

Modelo de Weibull (Mafart et al. 2001) (**Ecuación 17**):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde:

N representa la densidad celular microbiana;

N_0 la densidad celular microbiana inicial;

t es el tiempo;

δ es un parámetro de escala indicado como el tiempo para la primera reducción decimal y

p es el parámetro de forma que describe la concavidad o convexidad de la curva. Si $p > 1$ la curva muestra convexidad y si $p < 1$ la curva es cóncava.

Modelo de Weibull con cola (Albert y Mafart, 2005) (**Ecuación 18**):

$$\log_{10}(N) = \log_{10} \left((10^{\log N_0} - 10^{\log N_{res}}) * 10^{(-\frac{t}{\delta})^p} + 10^{\log N_{res}} \right) \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde:

N_{res} es el número de subpoblación de bacterias resistentes;

N_0 es la concentración bacteriana inicial;

N representa la densidad de las células microbianas;

δ es un parámetro de escala indicado como el tiempo para la primera reducción decimal y

p es el parámetro de forma que describe la concavidad o convexidad de la curva. Si $p > 1$ la curva muestra convexidad y si $p < 1$ la curva es cóncava.

Modelo Doble Weibull (Coroller et al. 2006) (**Ecuación 19**):

$$N(t) = \frac{N_0}{1 + 10^\alpha} \left[10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right] \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde:

N es el número de bacterias resistentes;

N_0 es la concentración bacteriana inicial;

t es el tiempo;

δ_1 es el parámetro que indica el tiempo para la primera reducción decimal;

δ_2 es el parámetro que indica la fase de crecimiento estacionario del cultivo y

p es el parámetro de forma que describe la concavidad o convexidad de la curva. Si $p > 1$ la curva muestra convexidad y si $p < 1$ la curva es cóncava.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Caracterización y evaluación del reactor UVC

Las características funcionales del reactor UVC han afectado notablemente en los resultados obtenidos en las diferentes matrices evaluadas al aplicar los tratamientos de radiación UVC (T1, T2 o T3). Uno de los factores principales a tener en consideración en el reactor utilizado en este estudio, fue que la distancia que debe recorrer la luz UVC para atravesar radialmente toda la matriz es de 1 mm, siendo éste uno de los pocos reactores que permiten conseguir un espacio tan reducido. La disminución del recorrido que debe realizar la radiación UVC, aumenta su exposición lo que permite conseguir una mayor efectividad del tratamiento (Lu, Li, y Liu, 2011). En contrapartida, la reducida distancia dificulta el que se pueda generar el flujo turbulento incluso cuando se aplican caudales elevados en matrices con densidad y viscosidad similares al agua. Como se observa en la **Tabla 12**, en el tratamiento T3 el que se aplica el caudal más elevado el valor de Reynolds es de 1015, por lo que sigue siendo laminar, ya que no se alcanza el valor de 2100 a partir del cual ya empieza a producirse este fenómeno (FDA, 2001).

El flujo turbulento, es de especial relevancia en la efectividad de la UVC, se ha observado que aumenta su efecto letal incluso en matrices que tienen un alto coeficiente de absorción (Matak et al. 2005; Choudhary et al. 2011; Lu et al. 2011; Bandla et al. 2012;). Este aumento de letalidad se debe a que se incrementa la probabilidad de contacto de la matriz con la zona más cercana a la fuente de emisión de la radiación UVC (Koutchma et al. 2009). Por lo tanto, en el efecto de la UVC no solo es importante la dosis aplicada sino también la posición y distancia a la fuente emisora de UV durante el tiempo de exposición (Koutchma, 2016). Hasta la fecha las dos estrategias planteadas con anterioridad son las que más se han utilizado en el diseño de los reactores de UVC de flujo continuo con el fin de superar la interferencia de una elevada absorbancia de la UVC y la turbidez asociada a ciertas matrices alimenticias (Koutchma, 2017).

Ante la imposibilidad de crear un flujo turbulento en el espacio por donde circula la matriz, debido a que la zona de tratamiento tiene un diámetro de 1 mm, se estudió la posibilidad de incrementar la probabilidad de contacto de la matriz con la zona más cercana a la fuente de emisión haciendo recircular la matriz a través del reactor. En este caso el tiempo de

exposición o la dosis de UVC aplicada se ve condicionada por la velocidad o caudal de flujo y por el número de ciclos. Así cuanto mayor fue el caudal aplicado mayor número veces debía recircularse la matriz para conseguir un mismo tiempo de exposición o dosis UVC.

A mayor velocidad de funcionamiento de la bomba peristáltica, mayor caudal y velocidad de recirculación, por lo tanto, más entradas y salidas. El resultado es que en los tratamientos T2 y T3, el número de veces que la matriz pasa por el reactor es diferente al variar la velocidad programada (RPM) por la bomba peristáltica, aun recibiendo la misma dosis de UVC (J/mL). A medida que aumenta el tiempo del tratamiento, la dosis aplicada en la matriz también aumenta. Por tanto, la diferencia fundamental viene dada por las RPM programadas en la bomba peristáltica, dando un diferente número de entradas y salidas de una partícula, o microorganismo presente en el producto. Por ejemplo, como se puede observar en la **Tabla 12**, en el tratamiento T2 a dosis de 160 J/mL dónde el producto está recirculando durante 2880 segundos (48 minutos), se puede comprobar que a una velocidad de la bomba peristáltica de 300 RPM el caudal es de 41,87 mL/s y se consigue 241,17 entradas y salidas del alimento testado. En cambio si se observa en el tratamiento T3 donde la velocidad de la bomba peristáltica es de 500 RPM y el caudal es de 64,6 mL/s, las entradas y salidas son 372,1 para conseguir la misma dosis (160 J/mL). En el caso del tratamiento T1, el caudal se adaptó para poder conseguir un mismo número de entradas y salidas del reactor independientemente de la dosis aplicada para, de esta manera, comprobar si el número de entradas y salidas del reactor influye de manera significativa en la letalidad de los microorganismos testados.

Tabla 12: Cálculo del número de entradas y salidas del reactor o número NET y valor Reynolds de cada uno de las condiciones de tratamiento UVC.

Tratamientos	Dosi (J/mL)	Caudal (mL/s)	Entradas/salidas del reactor (Nº NET)	RPM	Tiempo de exposición (s)	Reynolds
Desglose tratamiento 1 (T1)	10	5,83	2	43	12	105
	20	2,91		21	24	52
	40	1,46		12	48	26
	80	0,73		6	96	13
	100	0,58		5	120	10
	120	0,47		3	144	9
	160	0,27		1,5	192	7
Desglose tratamiento 2 (T2)	10	41,87	15,07	300	180	658
	20		30,15		360	
	40		60,29		720	
	80		120,59		1440	
	100		150,73		1800	
	120		180,88		2160	
	160		241,17		2880	
Desglose tratamiento 3 (T3)	10	64,60	23,26	500	180	1015
	20		46,51		360	
	40		93,02		720	
	80		186,05		1440	
	100		232,56		1800	
	120		279,07		2160	
	160		372,10		2880	

Para obtener el número de entradas y salidas de la matriz dentro del reactor, el primer paso fue calcular el caudal (mL/s) de cada una de las velocidades programadas en la bomba peristáltica. Una vez fijado el caudal, se calculó el tiempo que tarda una porción de la matriz en atravesar la longitud de la lámpara (673 cm). En particular el volumen para llenar el espacio entre la lámpara y pared externa con la longitud de ésta es de 70 mL. Para poder estandarizar los tratamientos, se recalculó en base a un volumen de muestra tratada de 1000 mL.

A este concepto se le llamará Número de Entradas al Túnel o NET que hace referencia al número de veces que una partícula entra y sale de un túnel o lámpara UVC y por lo tanto cambia de posición (distancia a la fuente de emisión UVC) y se expresa mediante la siguiente fórmula (**Ecuación 20**).

$$NET = \frac{t \cdot L \cdot C_A}{V_C} \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde t corresponde al tiempo del tratamiento, expresado en segundos, L al número de lámparas del reactor, C_A el caudal al que circula la matriz, expresado en mL/s y finalmente V_C que es el volumen total de alimento que está circulando por el circuito, expresado en mL.

Por ejemplo al calcular en número NET o número de entradas al túnel del tratamiento T3 en una dosis de 160 J/mL: se conoce que el caudal al que se trabaja es de 64,6 mL/s, el tiempo de tratamiento transcurrido para lograr 160 J/mL es de 2880 segundos y el volumen de la muestra es de 1000 mL. De esta manera el NET de estas condiciones es de 372,1.

$$372,1 = NET = \frac{2880 \cdot 2 \cdot 64,6}{1000}$$

El resultado sería que este volumen determinado de matriz en 2880 segundos de circulación entra y sale del reactor 372,1 veces.

La hipótesis central de este fenómeno se basa en los conceptos observados ya por Koutchma (2009), que describe las limitaciones de la luz UVC como método de inactivación microbiana. Según esta autora, los microorganismos deben estar expuestos directamente a la radiación UVC para absorber sus fotones, estimando que para lograr la

inactivación de los microorganismos estos tienen que estar expuestos a una dosis de al menos 1 mJ/cm^2 para causar un daño genético irreversible.

Cuando un líquido es opaco o turbio, como el licuado de soja o la leche, los fotones UVC no pueden penetrar profundamente en el líquido, por este motivo hay que conocer la profundidad efectiva de penetración de las matrices a 254 nm . En este caso, utilizando la ecuación de Lambert-Beer (**Ecuación 3**) y sabiendo que el paso de la matriz en el reactor del presente estudio es de 1 mm , se puede calcular el límite de la distancia efectiva donde la dosis es de 1 mJ/cm^2 (**Tabla 13**).

Tabla 13: Cálculo de la distancia efectiva, expresado en mm en la que la dosis recibida es próxima a 1 mJ/cm^2 con una intensidad de 41 mW/cm^2 .

Matriz	Dosis recibida (mJ/cm^2)	Distancia efectiva (mm)
Té verde	1,632	1
Leche UHT entera	1,035	0,02
	0,86	0,021
Leche UHT desnatada	1,005	0,061
	0,946	0,062
Licuado de soja	1,030	0,032
	0,918	0,033

De esta manera podemos observar que la leche entera, al tener el coeficiente de absorción más elevado en comparación a las otras matrices (**Tabla 16**), la distancia donde se asegura llegar a 1 mJ/cm^2 , es más reducida. En el caso del té verde, se puede observar que la dosis recibida es superior al 1 mJ/cm^2 en todo el espacio por donde pasa la matriz, por lo tanto se concluye que la distancia efectiva del tratamiento es todo el diámetro del reactor (1 mm).

Con estos resultados, es necesario crear un sistema UVC que esté diseñado para asegurar que todas las partículas o porciones de volumen en algún momento circulen lo más cercano posible a la superficie de la lámpara, esto mejorará la eficacia de la inactivación microbiana de la radiación UVC. Conociendo el espacio de efectividad es

posible calcular la Probabilidad que una Partícula pase por Zona Letal del Túnel o NEZ y se calcula mediante la siguiente fórmula (**Ecuación 21**).

$$NEZ = P \cdot NET \quad \text{Ecuación 21}$$

Dónde: P es la probabilidad de que la partícula o microorganismo con un tamaño de 1 μm pueda entrar en el espacio de efectividad o zona letal y se expresa mediante la siguiente fórmula (**Ecuación 22**).

$$P = \frac{AZ}{AT} \quad \text{Ecuación 22}$$

Dónde: AZ; es el ancho de la zona letal (que va a depender de la matriz analizada), expresado en μm , finalmente AT; que es el ancho del túnel o el espacio por donde pasa la matriz, expresado en μm .

Para poder desarrollar los cálculos, consideramos que el tamaño de la partícula analizada fuera de 1 μm (TP) y 1000 μm del paso de la matriz (AT). Según la matriz el ancho de la zona letal (AZ), variará. En otras palabras, la probabilidad de que la partícula o microorganismo pase por la zona letal cambiará según la matriz (**Tabla 14**).

Tabla 14: Cálculo de la probabilidad que una partícula se ubique en la zona efectiva (mm) según la matriz utilizada con una intensidad de 41 mW/cm².

	Té verde	Leche entera	Leche desnatada	Liculado de soja
Zona efectiva (mm)	1	0,02	0,061	0,032
Probabilidad	100%	2%	6,1%	3,2%

Una vez calculada la probabilidad, se pueden conocer el valor de NEZ. En la siguiente **Tabla 15**, para obtener la dosis de 160 J/mL, podemos calcular sobre la probabilidad de que a medida que aumentamos el número de pases, la probabilidad de que los microorganismos se posicionen en el área efectiva de penetración descrita para la leche, aumenta.

Tabla 15: Cálculo del valor NEZ para la dosis de 160 J/mL en cada uno de los tratamientos UVC (T1, T2 y T3) con una intensidad de 41 mW/cm².

NET a 160 J/mL	Valor NEZ			
	Té verde	Leche entera	Leche desnatada	Licuado de soja
Tratamiento 1	1,01	0,04	0,122	0,064
Tratamiento 2	241,17	4,82	14,71	7,72
Tratamiento 3	372,10	7,44	22,70	11,91

2. Caracterización de las matrices utilizadas

La **Tabla 16** muestra los valores obtenidos de las principales propiedades fisicoquímicas de las matrices utilizadas en el estudio, que pueden influir en la efectividad de los tratamientos de radiación UVC aplicados. En cuanto a los valores de pH, se puede observar que todas las matrices se acercan a la neutralidad, y tienen una densidad y viscosidad similares al agua. Por lo que respecta a la absorbancia y la turbidez, la leche desnatada, la leche entera y el licuado de soja pueden clasificarse como matrices de alta absorbancia, aunque se pueden observar diferencias entre ellas. Leche entera presentó los niveles más altos de absorbancia a 254 nm y turbidez, seguida por el licuado de soja y la leche desnatada. El té verde fue la matriz que presentó los valores de absorbancia y turbidez más reducidos.

Tabla 16: Principales características fisicoquímicas de las matrices utilizadas en este estudio.

	Té verde	Leche desnatada	Licuada de soja	Leche entera
Absorbancia a 254 nm (cm⁻¹)	14,2 ± 0,03	264 ± 0,03	500 ± 0,04	801 ± 0,02
Turbidez (NTU)	212,5 ± 0,054	18.416 ± 0,0408	35.983 ± 0,0408	77.967 ± 0,0121
pH	6,67 ± 0,02	6,68 ± 0,02	6,34 ± 0,01	6,67 ± 0,01
Viscosidad (Pa·s)	0,91 ± 0,01	1,707 ± 0,01	4,047 ± 0,03	2,082 ± 0,01
Densidad (g/mL)	1,002 ± 0,00	1,037 ± 0,00	1,014 ± 0,00	1,033 ± 0,00

NTU: Unidades nefelométrica de turbidez

Si se evalúa el espectro de emisión de la lámpara de LPM junto con los espectros de absorción de las diferentes matrices utilizadas en este estudio (**Figura 11**) se puede observar como la leche entera fue la matriz con más capacidad de absorber los fotones emitidos por la luz UVC, seguida por el licuado de soja y la leche desnatada. En cambio, en el caso del té verde, el pico de máxima emisión de la lámpara LPM no interfirió en la disponibilidad de los fotones de luz UVC.

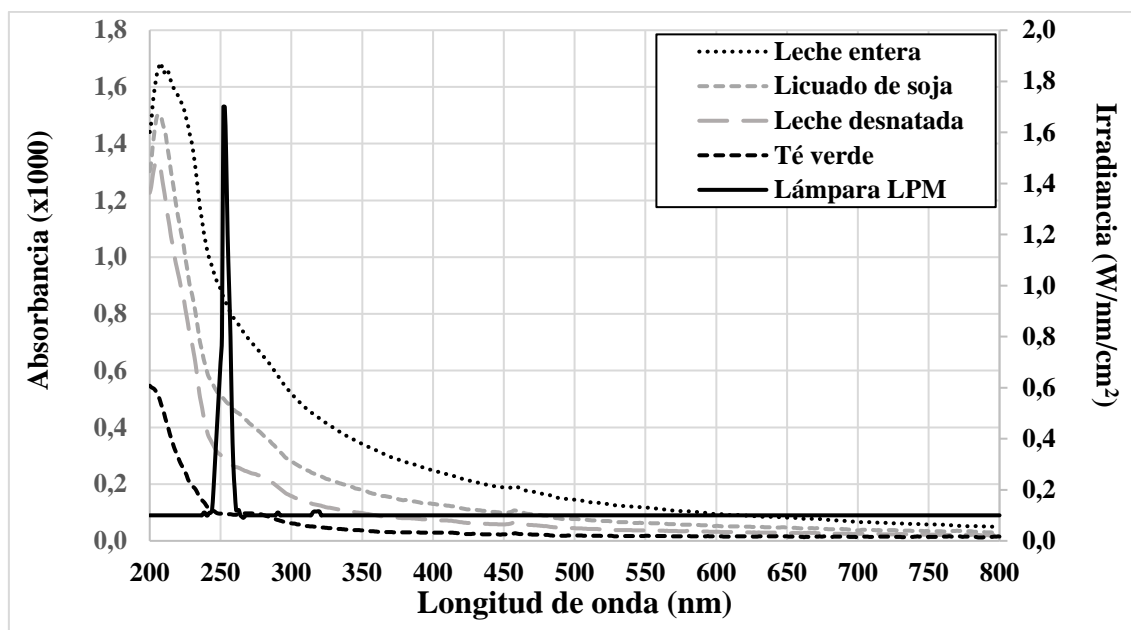


Figura 11: Espectro de absorción de las diferentes matrices utilizadas en este estudio con el espectro de emisión de la lámpara de LPM.

3. Efecto de las matrices en *B. subtilis* según el tratamiento aplicado

En la evaluación global del efecto de los tratamientos UVC en la letalidad de *B. subtilis* en función de la matriz alimentaria, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de letalidad según si la matriz utilizada tiene un bajo coeficiente de absorción (té verde) o si, por lo contrario, este coeficiente es mayor como en el caso de la leche entera, desnatada y licuado de soja, en este último caso no se apreciaron diferencias estadísticas ($p \geq 0,05$) entre estas matrices (**Tabla 17**).

Tabla 17: Efecto de la aplicación de UVC en comparaciones dos a dos.

Matriz	Matriz	p^*
Té verde	Leche desnatada	0,0005
Té verde	Licuado de soja	<0,0001
Té verde	Leche entera	<0,0001
Leche desnatada	Licuado de soja	0,0675
Leche desnatada	Leche entera	0,9237
Licuado de soja	Leche entera	0,2155

* $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas

3.1. Efecto de los tratamientos T1

Al comparar el comportamiento de las esporas de *B. subtilis* en cada una de las matrices tratadas (**Figura 12**), se pudo observar que el té verde siguió una pauta muy diferente a las otras matrices. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el efecto letal entre los resultados del té y los obtenidos en las otras matrices testadas. Entre los resultados del licuado de soja y las leches entera y desnatada no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$), siendo la letalidad obtenida de alrededor de 1 log en todas las dosis evaluadas. Solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las 3 matrices de alta absorbancia cuando se aplicó la dosis de UVC más alta (160 J/mL), en la que la leche entera presentó una mayor letalidad.

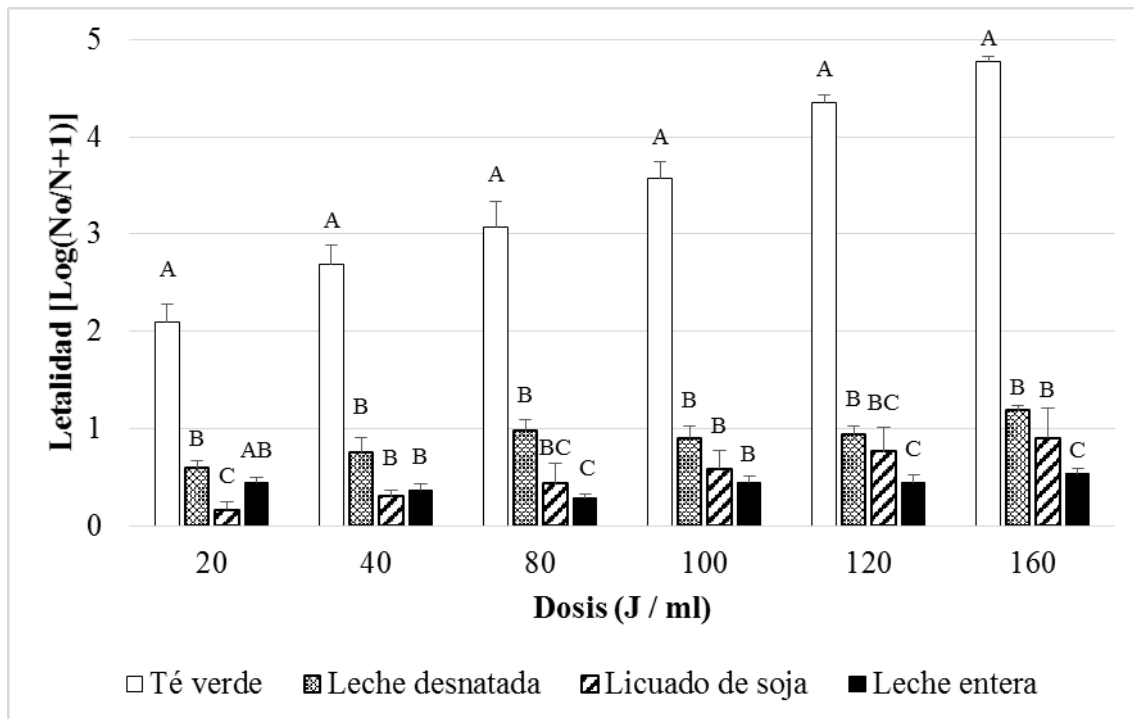


Figura 12: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde, licuado de soja, leche entera y leche desnatada con el tratamiento T1 UVC a diferentes dosis (J/mL). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las matrices a igual dosis de UVC.

3.2. Efecto de los tratamientos T2

En los tratamientos T2 (**Figura 13**), los resultados de letalidad en el té verde también fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) respecto a las otras matrices en las dosis más suaves (20 y 40 J/mL), siendo el licuado de soja el que mostró una letalidad inferior, especialmente a 40 y 80 J/mL ($p < 0,05$). A la dosis de 100 y 120 J/mL, la letalidad del té verde y la soja fue inferior a la leche entera y desnatada ($p < 0,05$), mientras que a la dosis más elevada (160 J/mL), la letalidad obtenida fue similar en las cuatro matrices.

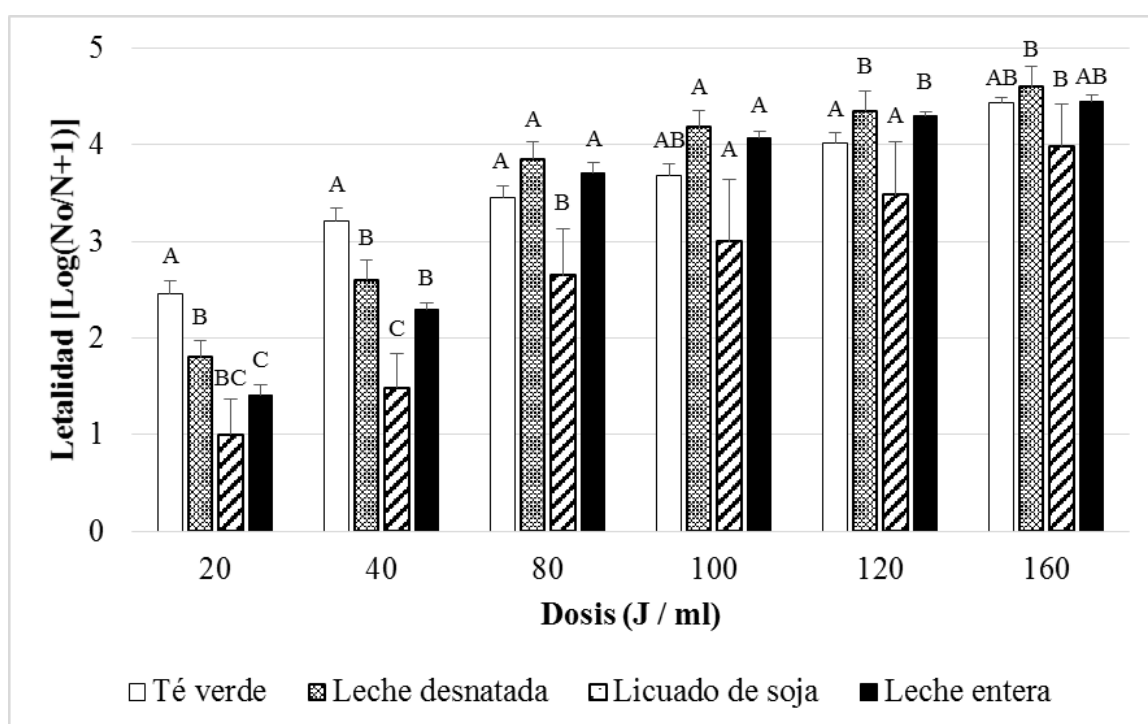


Figura 13: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde, licuado de soja, leche entera y leche desnatada con el tratamiento T2 UVC a diferentes dosis (J/mL). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las matrices a igual dosis de UVC.

3.3. Efecto de los tratamientos T3

Al someter las muestras inoculadas con *B. subtilis* a los tratamientos T3 se observó que el comportamiento de las 4 matrices siguió una tendencia en la letalidad bastante similar (**Figura 14**). Solo a las dosis más suaves (20 J/mL y 40 J/mL) se apreciaron diferencias en la que el licuado de soja que mostró una letalidad significativamente inferior ($p < 0,05$) respecto a las otras 3 matrices. A partir de la dosis de 40 J/mL la diferencia en la letalidad obtenida entre las diferentes matrices fue muy leve o inexistente.

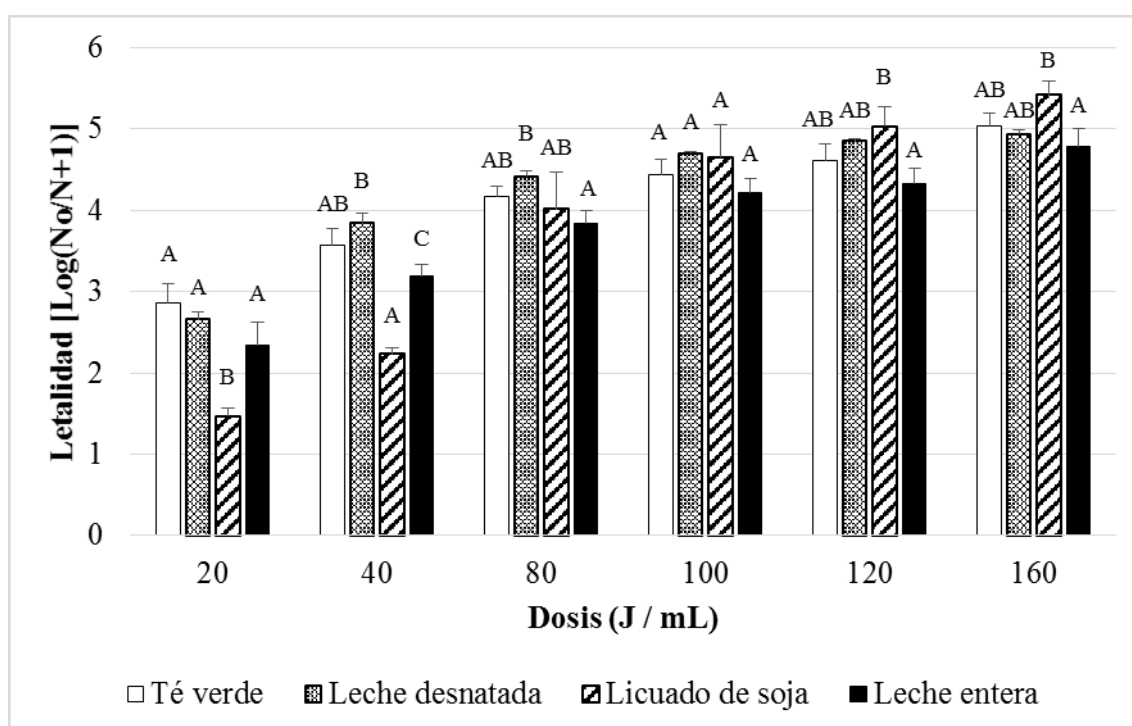


Figura 14: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde, licuado de soja, leche entera y leche desnatada con el tratamiento T3 UVC a diferentes dosis (J/mL). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las matrices a igual dosis de UVC.

3.4. Efecto general de las matrices

Los resultados obtenidos al tratar la leche entera, leche desnatada y licuado de soja siguen una tendencia bastante parecida debido a que las tres matrices se pueden considerar que tienen un coeficiente de absorbancia alto. Según estos resultados, se puede concluir que aumentando el valor NET se puede conseguir una mayor letalidad

aplicando la misma dosis de UVC. En este caso, la dosis de UVC no fue un parámetro crítico del proceso para conseguir eficacia germicida, tal y como expresó Koutchma (2016). Sin embargo, el valor de NET, en este reactor, fue crítico para determinar el nivel de letalidad de los microorganismos. Por lo tanto, para matrices de alto coeficiente de absorción, el sistema UVC debería de estar diseñado para asegurar que cada partícula o porción de volumen esté en algún momento en un punto dentro de la profundidad efectiva en que la lámpara incrementa su eficacia germicida, es decir, teniendo en cuenta el valor NEZ calculado con anterioridad (**Ecuación 21**).

Por otro lado, en el caso del té verde (matriz con coeficiente de absorbancia bajo) se puede observar que el hecho de aplicar el tratamiento T1, T2 o T3, asociado a diferentes valores de NET, no influye directamente en la letalidad de los microorganismos, ya que la radiación UVC puede penetrar fácilmente a través de la matriz y alcanzar toda la profundidad del reactor. Por lo tanto, en matrices de bajo coeficiente de absorción, el factor determinante en la efectividad del tratamiento es la dosis aplicada y no tanto en el valor NET.

Resulta altamente complejo comparar los resultados obtenidos con los de diferentes estudios (y autores) ya que, como se explicó en la introducción (**Figura 6**), hay diferentes variables que pueden influir sobre la efectividad de un tratamiento y no en todos los casos se facilita toda la información necesaria para poder caracterizar el tratamiento. Además, el poco consenso entre estudios en el momento de expresar las dosis aplicadas dificulta el poder comparar resultados con otros estudios. Otra de las limitaciones que se enfrenta esta tecnología es que no se han encontrado referencias previas sobre el efecto de la radiación UVC en té verde y pocos estudios realizados en licuado de soja. En consecuencia, los resultados obtenidos se compararán con los descritos en estudios anteriores en los que se determinó el efecto de la UVC sobre *A. niger*, *B. subtilis*, *E. coli* y *L. monocytogenes* en otras matrices.

4. Efecto de los tratamientos UVC sobre esporas de *B. subtilis* en diferentes matrices

4.1. Té verde

En la **Figura 15**, se muestra la letalidad de las esporas de *B. subtilis* tras diferentes condiciones de tratamiento UVC. La tasa de letalidad aumentó de manera proporcional a medida que incrementó la dosis de UVC en todos los tratamientos aplicados. Entre los tratamientos T2 y T3 no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) cuando se aplicaron las dosis entre 10 y 40 J/mL, pero sí las hubo ($p < 0,05$) entre estos tratamientos y el tratamiento T1. A partir de la dosis de UVC de 80 J/mL, en general se consiguió una mayor letalidad ($p < 0,05$) con el tratamiento T3, alcanzándose una reducción de 5 log con el tratamiento de 160 J/mL. La letalidad obtenida con los tratamientos T1 y T2 fue muy similar y aumentó al incrementar la dosis, aunque fue inferior a la obtenida con T3.

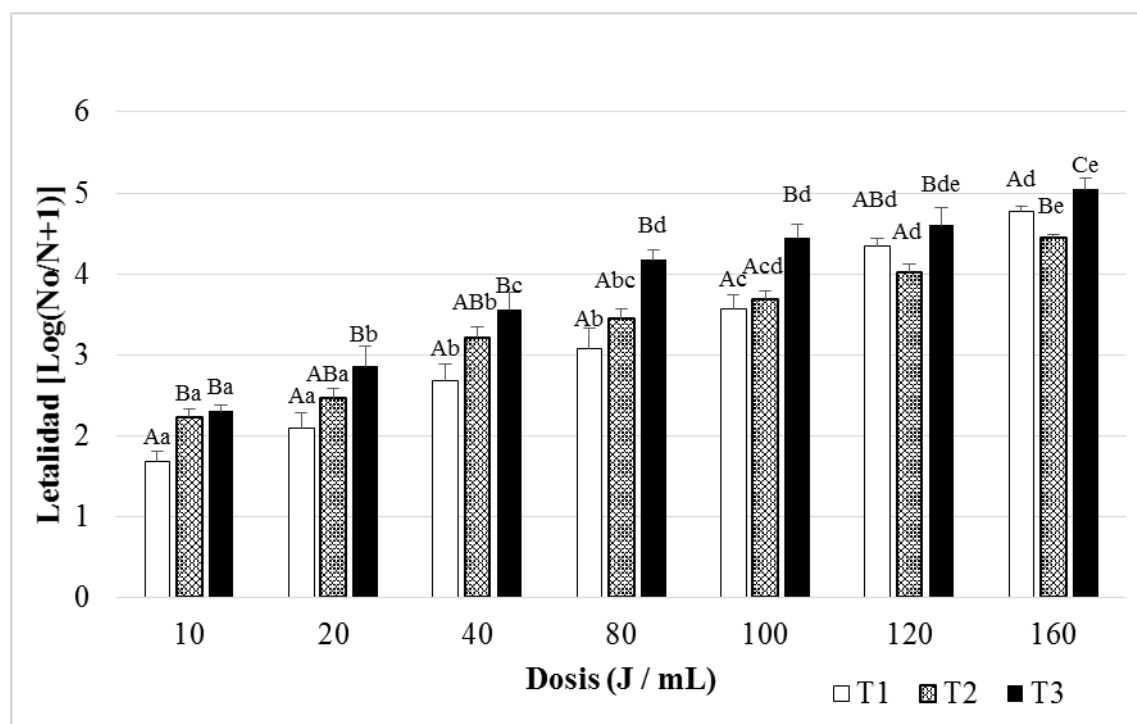


Figura 15: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias

significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

Un efecto a considerar en los tratamientos UVC, es la temperatura a la que se aplica, ya que se han determinado cierta sinergia al aplicar en ciertas combinaciones de UVC y temperatura suave (45 y 50 °C) (García Carrillo, Ferrario y Guerrero, 2017). Por ello, se evaluó el posible efecto aditivo o sinérgico de la aplicación de diferentes temperaturas (4, 20 y 50 °C) en el tratamiento T2, en relación a la letalidad de las esporas de *B. subtilis*, determinándose que, en la condiciones aplicadas con el reactor utilizado, esta factor no tuvo efecto en la letalidad obtenida, ya que no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las diferentes temperaturas y dosis aplicadas (**Figura 16**).

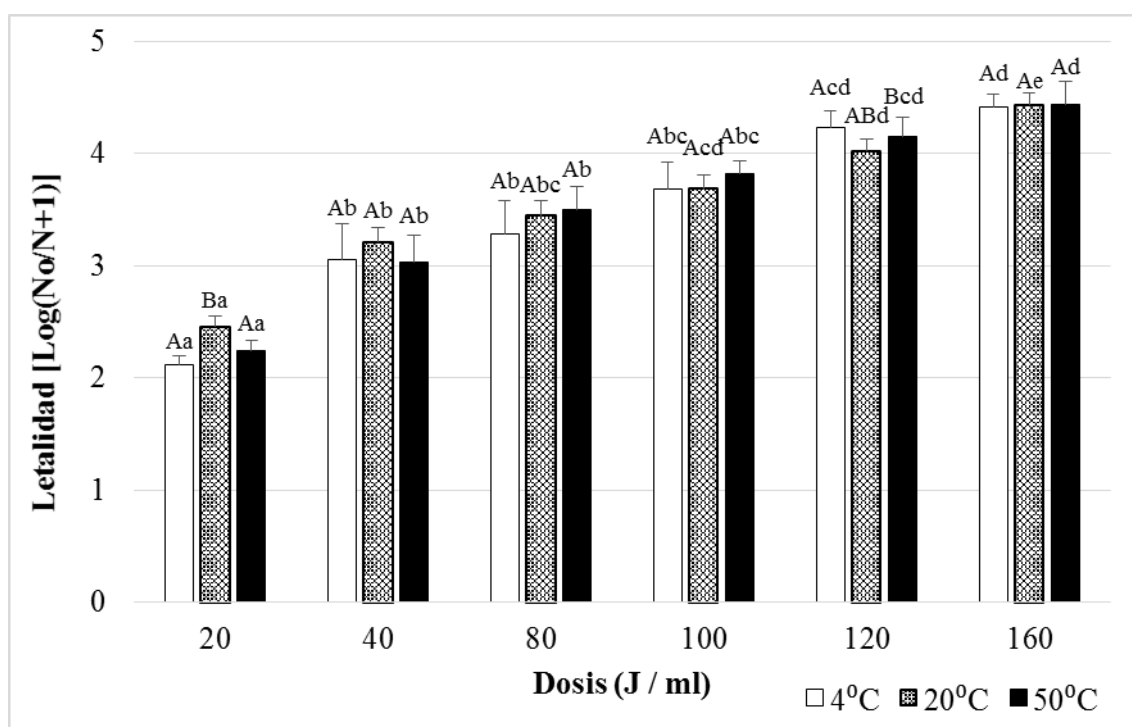


Figura 16: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en té verde causados por el tratamiento T2 a diferentes dosis (J/mL) y diferentes temperaturas (4, 20 y 50 °C). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre

tratamientos a la misma temperatura pero a diferentes dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas pero igual dosis de UVC.

4.2. Licuado de soja

En la **Figura 17** se pueden observar la letalidad obtenida en las esporas de *B. subtilis* y la variación de su comportamiento en función de las condiciones de tratamiento ensayadas. En el tratamiento T1, no se consiguió sobrepasar 1 log de reducción a ninguna de las dosis estudiadas, aunque si se vio un cierto efecto letal al incrementarlas. Sin embargo, cuando se aplicaron los tratamientos T2 y T3, la letalidad aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) al aumentar la dosis, siendo el tratamiento T3 más efectivo que el tratamiento T2 a partir de dosis de 80 J/mL. En el caso del tratamiento T3, se alcanzó una reducción igual o superior a 5 log a partir de la dosis de 120 J/mL.

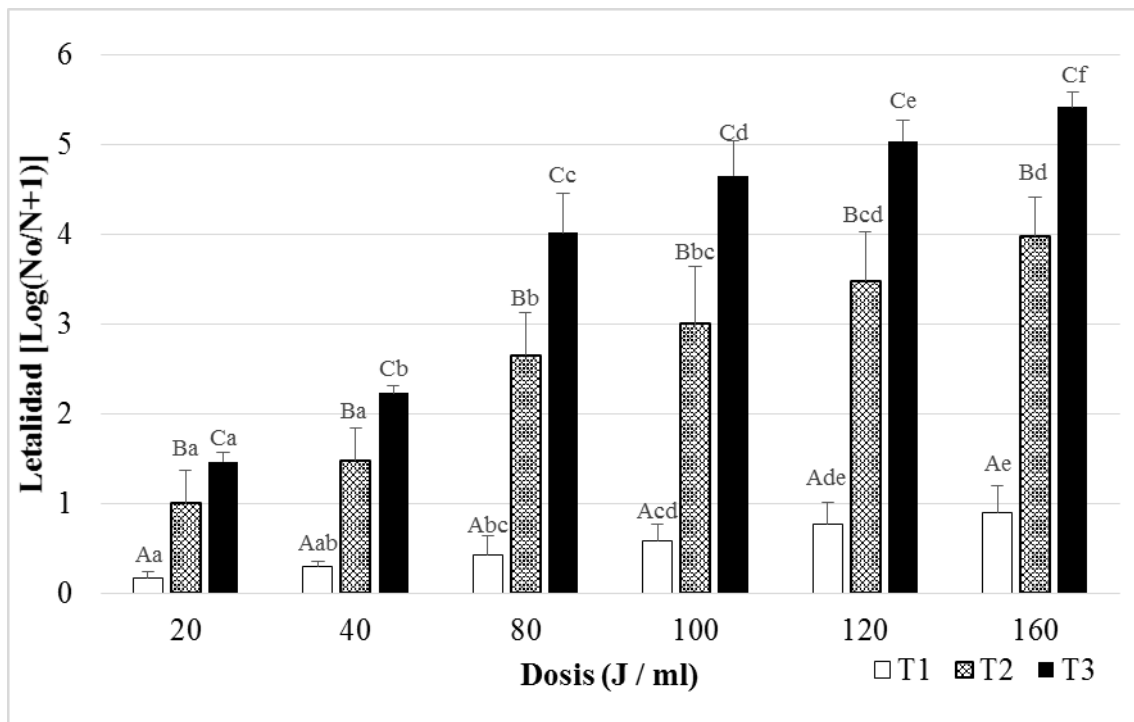


Figura 17: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican

diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

4.3. Leche entera

En la **Figura 18** se representan los resultados de letalidad obtenidos después de someter leche entera inoculada con esporas de *B. subtilis* a diferentes tratamientos con UVC. Se observa que, como en el caso del licuado de soja (**Figura 17**), la letalidad de los tratamientos T1 es muy reducida (entorno al 0,5 log), independientemente de la dosis aplicada. Igualmente, como en el caso del licuado de soja, al someterlas a los tratamientos T2 y T3 se observó un aumento notable de la letalidad al incrementar la dosis, especialmente a dosis de entre 20 y 80 J/mL, para posteriormente aumentar muy paulatinamente. La letalidad solo fue significativamente superior ($p < 0,05$) en los tratatamientos T3 respecto T2 a dosis de 20 y 40 J/mL. En esta matriz, en ninguno de los tratamientos aplicados se alcanzó una letalidad media de 5 log, consiguiendo la letalidad más próxima a este valor cuando se aplicó el tratamiento T3 a 160 J/mL.

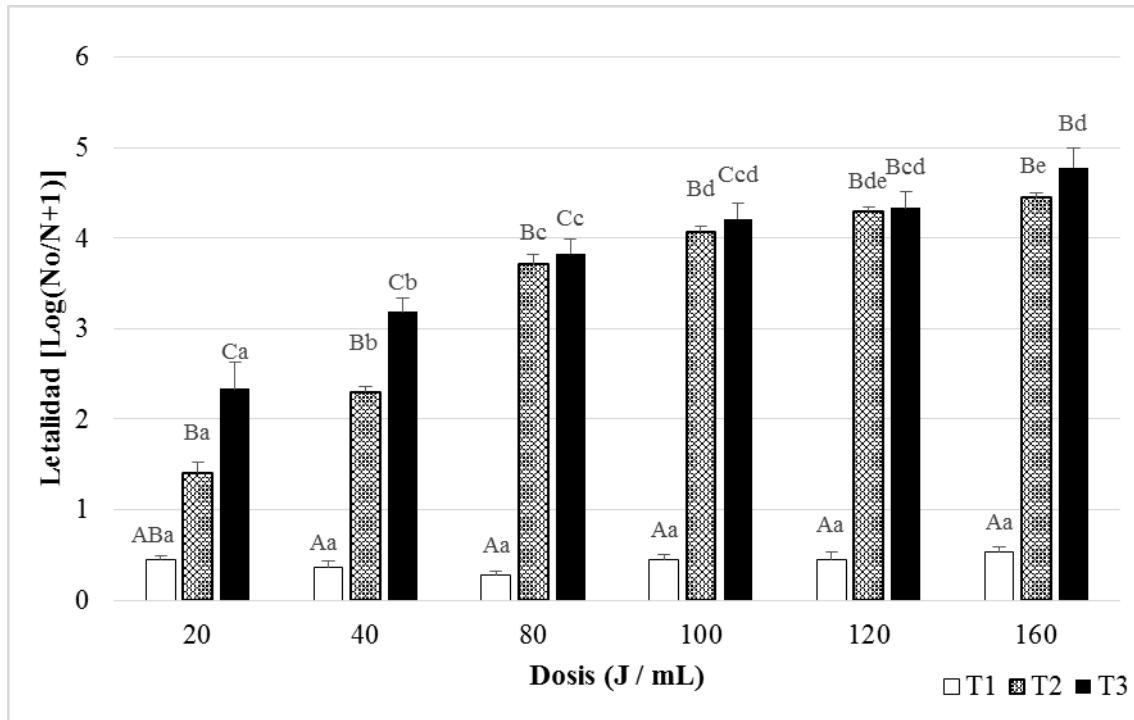


Figura 18: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche entera causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuento iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

4.4. Leche desnatada

Al tratar con UVC la leche desnatada inoculada con esporas de *B. subtilis* (**Figura 19**), la letalidad obtenida varió según el tipo de tratamiento aplicado. A cualquiera de las dosis aplicadas, la letalidad obtenida en los tratamientos T1 fue muy reducidos (entrono a 1 log), de forma similar a las otras matrices, especialmente del licuado de soja (**Figura 17**). Igualmente como en las otras matrices de alto coeficiente de absorción, al aplicar los tratamientos T2 y T3 se observó un aumento notable de la letalidad al incrementar la dosis, especialmente a dosis de entre 20 y 80 J/mL, para posteriormente aumentar muy

paulatinamente, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos T2 y T3. Como en el caso de la leche entera, en esta matriz, en ninguno de los tratamientos aplicados se alcanzó una letalidad de 5 log, siendo los más próximos a esta letalidad los tratamientos T3 a 120 y 160 J/mL.

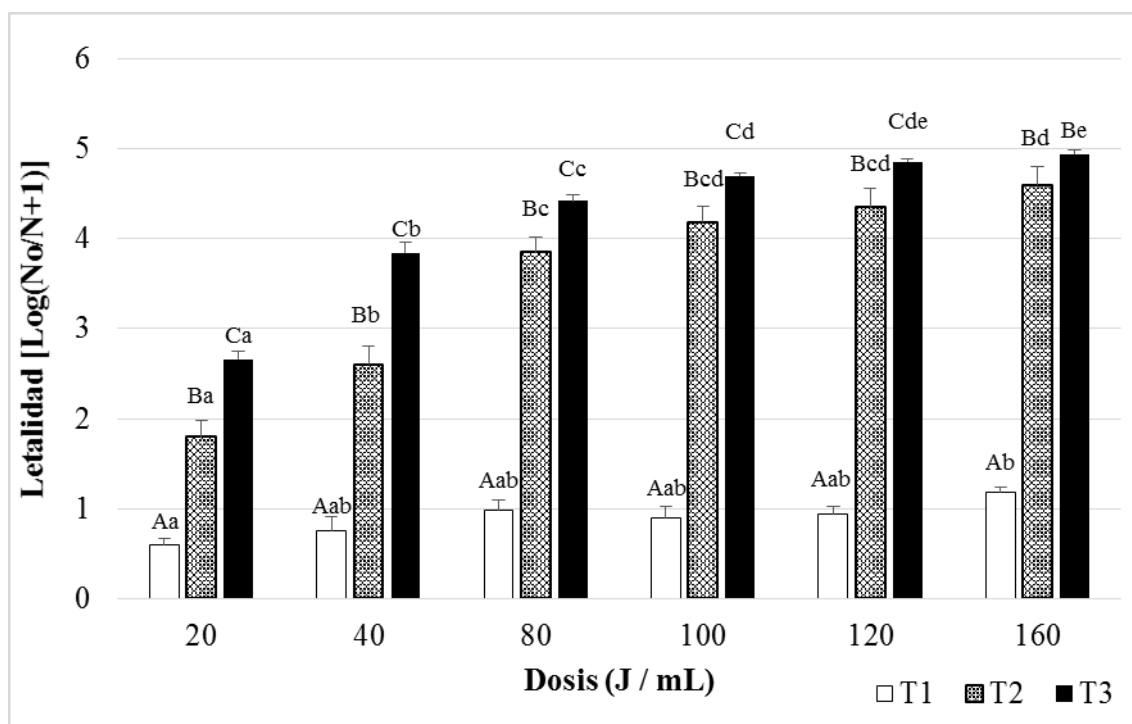


Figura 19: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche desnatada causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

5. Discusión del efecto de los tratamientos UVC sobre las esporas de *B. subtilis* en diferentes matrices

En matrices con baja absorbancia podemos encontrar diferentes estudios realizados con esporas de *B. subtilis*, utilizado comúnmente como organismo de control en bioensayos

en agua tratada con UVC, debido a su moderada resistencia. Las dosis necesarias para su inactivación son muy diferentes, ya que como se mencionó anteriormente son varios los factores que influyen en la letalidad microbiana (**Figura 6**). Además, en ocasiones los resultados no pueden ser comparados, debido a que las dosis aplicadas difieren en sus unidades, siendo difícil hacer la equiparación por desconocimiento de las características del reactor.

En el caso del agua, la dosis necesaria para reducir entre 0,8 y una unidad logarítmica de este microorganismo varían desde 18 mJ/cm² (Zhang, Zhou y Zhang, 2014), 36 mJ/cm² (Chang et al. 1985) y 0,8 J/mL (Yousefzadeh et al. 2018). En otros estudios realizados con modelos líquidos parecidos al agua pero con mayor coeficiente de absorción (0,42 cm⁻¹) fue necesario aplicar una dosis de 20-22 mJ/cm² para conseguir una reducción de 1 log (Sommer et al. 1999). En la presente tesis, al tratar el té verde, la letalidad fue superior a 1 log en la dosis mínima aplicada (10 J/mL ó 1053 mJ/cm²) en los tratamientos T1, T2 y T3 (1,7, 2,23 y 2,3 log respectivamente).

Aplicando una dosis de 7,5 J/mL (759 mJ/cm²), Reverter-Carrión et al. (2018) consiguieron una reducción de 5 log en tampón PBS suplementado con caramelo (con un coeficiente de absorción de 26 cm⁻¹), usando el mismo reactor que en el presente estudio y en un solo pase. Sin embargo, para alcanzar ese nivel de inactivación en té verde (14 cm⁻¹), en esta tesis fue necesario aplicar dosis más elevadas, concretamente de 160 J/mL (equivalente a 166.460 mJ/cm²) con el T1 (un solo pase) (**Figura 16**).

Existe, por tanto, una gran variedad de dosis propuestas para reducir una cierta carga de este microorganismo en matrices con un grado de interferencia muy bajo. Este fenómeno se puede explicar, por un lado, por el diseño del reactor y por las propiedades intrínsecas de la matriz. El té verde en particular, tiene un alto contenido en compuestos antioxidantes que podrían absorber parte de la radiación UVC, protegiendo de su acción a los microorganismos presentes (Atomssa y Gholap, 2015).

En el caso de matrices con alto coeficiente de absorción, concretamente en leche entera y desnatada, Choudhary et al. (2011) estudiaron el comportamiento de tratamientos UVC sobre otro microorganismo esporulado, *B. cereus*, con un coeficiente de absorción de 220 cm⁻¹ para la leche entera y 170 cm⁻¹ para la leche desnatada. En la presente tesis, la absorbancia fue moderadamente más elevada (801 cm⁻¹ para la leche de vaca entera y

264 cm^{-1} para la leche desnatada), posiblemente debido a que, la leche entera y desnatada fueron leches comerciales tratadas térmicamente por UHT y homogenizadas. La letalidad obtenida por Choudhary et al. (2011), fue de 2,65 log para la leche de vaca entera y 2,75 log para leche desnatada, aplicando una dosis de 11.187 mJ/cm^2 , con un Re más elevado (713) y con un diámetro interior del reactor de 1,6 mm,. Dicha letalidad fueron similar a la obtenida en el presente estudio con el tratamiento T3 a una dosis de 40 J/mL (4.165,6 mJ/cm^2) para la leche entera y de 20 J/mL (2.082,8 mJ/cm^2) para la leche desnatada (**Figura 18 y 19**). En cualquier caso, en ambos estudios, la eficiencia de inactivación fue mayor en la leche desnatada que en la leche entera, probablemente debido a la diferencia entre los coeficientes de absorción UVC de ambos tipos de leche y su valor de la turbidez (**Tabla 16**). Similares resultados, fueron obtenidos por Matak, (2004), quienes determinaron que en leche desnatada (0% en grasa), semidesnatada (2% en grasa) y entera (3,25% en grasa) inoculada con una cepa subrogada de *E. coli* O157:H7 (ATCC 25922), se conseguían letalidades superiores en la leche con menor contenido en grasa.

En el caso del licuado de soja, Bandla et al. (2012) también evaluaron el efecto de UVC en esporas de *B. cereus*, aunque el coeficiente de absorción fue considerablemente inferior (163 cm^{-1}) al licuado de soja de esta tesis (500 cm^{-1}). El reactor utilizado por estos autores, era de tubo en espiral, con diferentes diámetros internos (de 1,6 mm y 3,2 mm), generando diferentes valores de Re, siendo más elevados que los conseguidos en este estudio, y aplicando siempre la misma dosis de 11.187 mJ/cm^2 . En estas condiciones, lograron reducciones de 3,22 log con el diámetro más pequeño de 1,66 log con el mayor diámetro interno con un Re de 1.376. En esta tesis se consiguieron letalidades de 1,47 log para una dosis de 20 J/mL equivalente a 2.082,8 mJ/cm^2 en el tratamiento T3 y de 4 log para una dosis de 80 J/mL equivalente a 8.323 mJ/cm^2 (**Figura 17**).

Si bien según los resultados de Choudhary et al. (2011) como Bandla et al. (2012) en se concluye que en matrices de alta absorbancia el efecto del número Re influye en la letalidad, basándonos en nuestro resultados parece tener más relevancia el número de pases o NET. Este resultado puede explicarse por la teoría de capa límite planteada por Prandtl (1925), en la que se explica que un fluido en movimiento tiende a perder velocidad al estar en contacto con una pequeña capa adyacente del sólido, debido a las

pérdidas por fricción. Así, que en este caso, cuando la matriz está en contacto con el cuarzo de la lámpara pierde velocidad, disminuyendo así el número Re , con la posibilidad de que se creen capas laminares que no se intercambiarían con el resto de capas que circulan turbulentamente ($Re > 2.100$) y, como consecuencia, disminuye su efectividad asociada a a este factor.

Por lo tanto, en matrices de alta absorbancia, la aplicación de tratamientos UVC en reactores lineales en los que el espacio de la zona efectiva de tratamiento es muy reducida, parece ser más conveniente para incrementar la letalidad microbiana, aumentar el número de pases o valor NET, que no aumentar el valor Re .

6. Efecto de los tratamientos UVC sobre conidiosporas de *A. niger* en té verde y licuado de soja

6.1. Té verde

En la **Figura 20**, se muestra que, a diferencia de lo observado con *B. subtilis*, con el tratamiento T3 no consiguió reducir 5 log de esporas de *A. niger* ni siquiera a la mayor dosis de UVC, aunque sí se consiguió la letalidad más alta de todos los tratamientos aplicados. La letalidad obtenida, de forma similar a lo que se observó con *B. subtilis* (**Figura 16**), aumentó a medida que se incrementó la dosis aplicada en los tres tratamientos. De forma general, se apreciaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre los tres tratamientos aplicados a las diferentes dosis, con excepción de 40 J/mL y 160 J/mL, donde no se determinaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre el T2 y T3, siendo el tratamiento T3 el que parece mostrar una mayor efectividad en cuanto a letalidad de las conidiosporas de *A. niger*, como ya se observó con las esporas de *B. subtilis* (**Figura 16**).

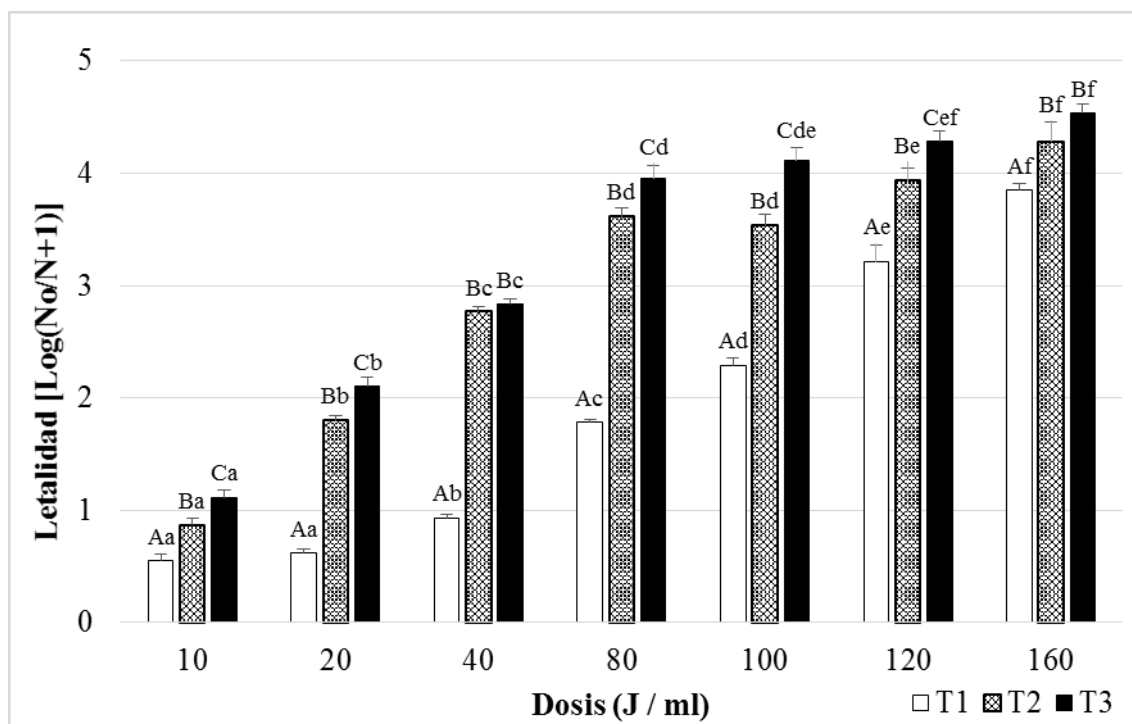


Figura 20: Niveles de reducción de los recuentos de conidiosporas de *A. niger* inoculadas en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

6.2. Licuado de soja

La **Figura 21** muestra los resultados obtenidos después de tratar con radiación UVC el licuado de soja inoculado con conidiosporas de *A. niger*. En este caso, también se observó una tendencia en la letalidad muy similar a la obtenida con *B. subtilis* (**Figura 17**), especialmente en el tratamiento T1. A cualquiera de las dosis aplicadas del tratamiento T1 la letalidad conseguida fue inferior a 1 log. Cuando se aplicaron los tratamientos T2 y T3, la letalidad aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) al aumentar la dosis, siendo esta letalidad generalmente superior en los tratamientos T3 a partir de la

dosis de 80 J/mL, obteniéndose a la dosis 160 J/mL una letalidad superior a 5 logaritmos.

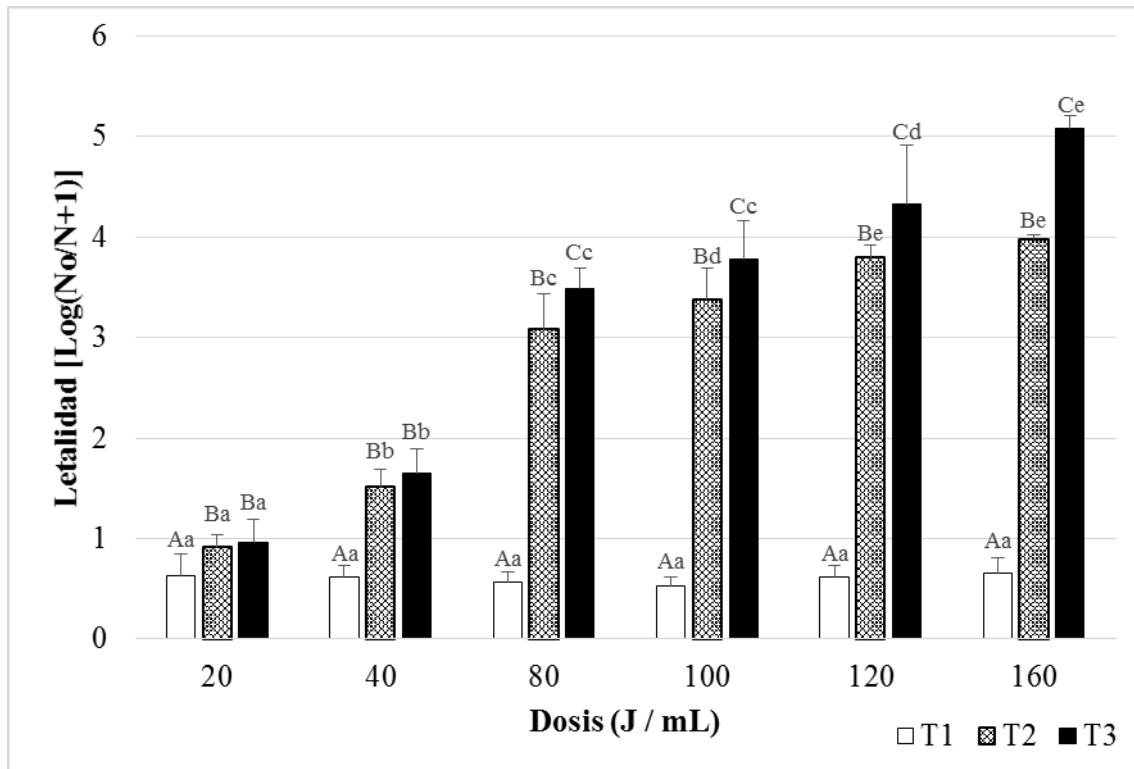


Figura 21: Niveles de reducción de los recuentos de conidiosporas de *A. niger* inoculadas en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

7. Discusión del efecto de los tratamientos UVC sobre las conidiosporas de *A. niger*

Son pocos los estudios realizados con este microorganismo en matrices alimentarias líquidas. Uno a tener en consideración es el de Reverter-Carrión et al. (2018), que lograron una reducción de aproximadamente 4 log a 14,3 J/mL en una solución de PBS con caramelo (coeficiente de absorción de 26 cm⁻¹) inoculada con esporas de *A. niger*.

En este estudio, se trató el té verde (coeficiente de 14 cm^{-1}) con una dosis de 160 J/mL y se obtuvo una reducción de 4 log con los tratamientos T1 y T2, y de 80 J/mL con el tratamiento T3 (**Figura 20**). Estos autores usaron exactamente el mismo reactor que en esta tesis (UV-Therm, Ypsicon S.L., Barcelona, España) y en las mismas condiciones. No obstante, las tasas de letalidad de *A. niger* y *B. subtilis* obtenidas con el té verde, con una matriz de coeficiente de absorción parecido al PBS con caramelo, difieren ampliamente de las obtenidas en el estudio de Reverter-Carrión et al. (2018). Estas alteraciones llevan a pensar que los compuestos específicos de la matriz (té verde) podrían desempeñar un papel protector, mermando la eficacia de la UVC, así como el formato de administrar una misma dosis, con 1 sólo pase (T1) o múltiples pases (T2 y T3) donde los fenómenos NET podrían tener influencia (Atomssa y Gholap, 2015).

Respecto al licuado de soja, solo se puede realizar cierta comparación con estudios realizados en leche y horchata, como matrices con un alto coeficiente de absorción. En los estudios realizados en estas matrices, no se evaluó la reducción de *A. niger*, sino de forma más genérica mohos y levaduras (Corrales et al. 2012; Engin y Karagul Yuceer, 2012). En leche, la letalidad obtenida fue de 3,78 log en los recuentos de mohos y levaduras tras aplicar una dosis de $13,87 \text{ J/mL}$ (Engin y Karagul Yuceer, 2012), mientras que en horchata la reducción fue de 3 log con una dosis de 4230 mJ/cm^2 (Corrales et al., 2012). En esta tesis, para conseguir letalidades similares en el licuado de soja inoculado con conidiosporas de *A. niger* fue necesaria la aplicar dosis entre 80 J/mL (8.323 mJ/cm^2) y 100 J/mL (10.414 mJ/cm^2) con los tratamientos T2 o T3 (**Figura 21**). Dichas diferencias son explicables, tanto por las diferencias en los coeficientes de absorción de las matrices y sobre todo porque el hongo filamentoso utilizado en el presente estudio en estado de conidiospora (*A. niger*) es considerado el microorganismo más UVC resistente hasta ahora conocido, debido a su pigmentación, la melanina (Jun et al. 2003; Begum et al. 2009; Esbelin et al. 2013).

8. Efecto de los tratamientos UVC sobre *E. coli* en té verde y licuado de soja

8.1. Té verde

En este caso, se alcanzó una letalidad superior a 5 log en todas las condiciones de tratamiento ensayadas (T1, T2 y T3), aunque la dosis necesaria varió según el tipo de tratamiento. En los tratamientos T1 y T2 dicha letalidad se obtuvo a partir de dosis de 80 J/mL mientras que con el tratamiento T3 con la primera dosis aplicada (10 J/mL) ya se consiguió una letalidad de 5 log. Además con este mismo tratamiento (T3) con una dosis de 40 J/mL se obtuvo una letalidad completa (se llegó al límite de detección) mientras que con el tratamiento T2 se necesitaron 120 J/mL, a pesar que no se apreciaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre estos dos tratamientos (T2 y T3) a partir de la dosis de 80 J/mL (**Figura 22**).

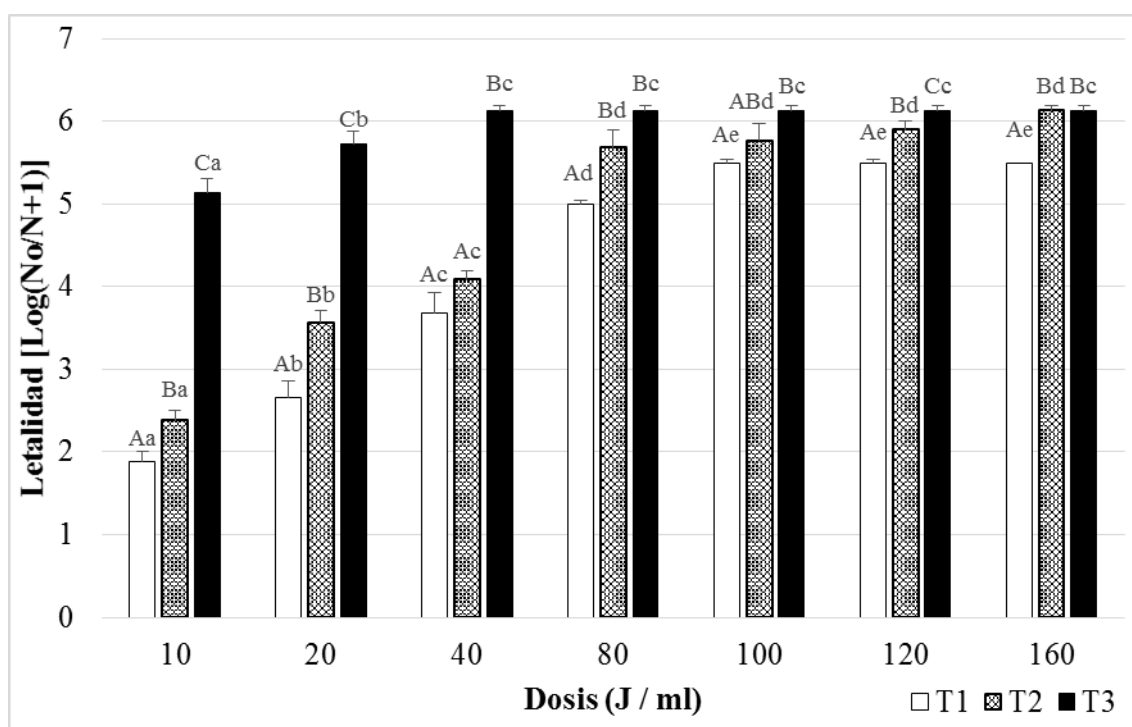


Figura 22: Niveles de reducción de los recuentos de *E. coli* inoculado en té verde causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de

UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

8.2. Licuado de soja

Al tratar el licuado de soja inoculado con *E. coli*, se observó una tendencia similar a la observada en los microorganismos anteriores (**Figura 23**). Con el tratamiento T1 la letalidad se mantiene entorno a 1 log, no observándose diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en ninguna de las dosis aplicadas. Los resultados varían cuando a las mismas dosis se le aplican los tratamientos T2 y T3. En este caso, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre T1, T2 y T3 a todas las dosis excepto a la más baja (20 J/mL). La letalidad obtenida en T2 y T3 aumentó de forma significativa al aumentar la dosis, obteniéndose la letalidad completa (superior a 6 log) en el tratamiento T3 a una dosis de 160 J/mL, aunque con una dosis de 120 J/mL ya se alcanzó una letalidad superior a 5 log.

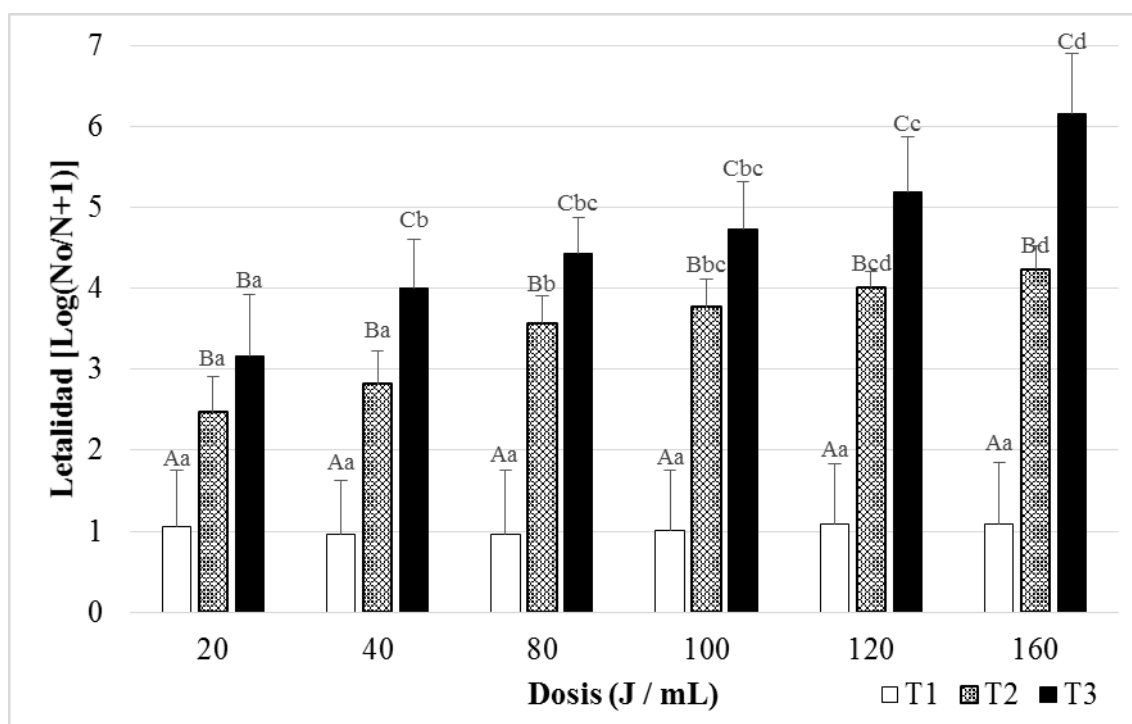


Figura 23: Niveles de reducción de los recuentos de *E. coli* inoculado en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm

DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

9. Discusión del efecto de los tratamientos UVC sobre *E. coli*

Al no encontrar estudios sobre el efecto sobre la letalidad de los tratamientos de UVC en té verde, la discusión se realizará con matrices alimentarias con cierta similitud en el coeficiente de absorción, como son el té Roiboos (Monyethabeng y Krügel, 2016) y el zumo de manzana (Koutchma et al. 2004).

En el caso de té Roiboos para obtener una reducción de 4,37 log de *E. coli*, fue necesaria una dosis de 3,68 J/mL (Monyethabeng y Krügel, 2016), mientras que en la presente tesis fueron necesarias dosis de 10 J/mL en el tratamiento T2 y en el tratamiento T3 para reducir 2,3 log y 5,1 log respectivamente (**Figura 20**). Esta diferencia, puede ser debida como se comentó anteriormente, a la distinta composición del té verde respecto al té Rooibos, el cual puede contener compuestos capaces de absorber, dispersar o reflejar mejor la radiación UVC (Atomssa y Gholap, 2015). Por el contrario, en zumo de manzana clarificado con un coeficiente de absorción de $5,7 \text{ cm}^{-1}$, la reducción obtenida tras un tratamiento de 15 J/mL con un flujo de 56,8 mL/s y un pase fue de 1,4 log (Koutchma et al. 2004). Sin embargo, en el té verde con un coeficiente de absorción mayor (14 cm^{-1}), aplicando el tratamiento T3 con una dosis y flujo similares se obtuvo una letalidad de 5 log UFC/mL (**Figura 21**).

Respecto a las matrices con un elevado coeficiente de absorción, los estudios del efecto UVC sobre *E. coli* se han evaluado tanto en licuado de soja como en leche. Concretamente en el caso del licuado de soja, (Bandla et al. (2012) realizaron el estudio de inactivación mediante UVC con la misma cepa y la misma matriz que en este estudio, aunque con un coeficiente de absorción considerablemente menor (159 cm^{-1}). Sin embargo, utilizaron un reactor con tubo en espiral con diferentes diámetros internos (1,6 mm y 3,2 mm), consiguiendo así valores de Re más elevados. En estas condiciones, lograron reducciones de 5 log con el diámetro interno más pequeño (1,6 mm) y de 2,95 log con el diámetro más grande (3,2 mm de diámetro interno) con un valor Re más alto (1.376) y una dosis de 11.187 mJ/cm^2 . Sin embargo, en el licuado de

soja del presente estudio con un coeficiente de 500 cm^{-1} , para conseguir letalidades similares con el tratamiento T3, fue suficiente una dosis de 20 J/mL ($2.082,8 \text{ mJ/cm}^2$) y 120 J/mL ($12.482,02 \text{ mJ/cm}^2$) para una reducción de 3 y 5,1 log, respectivamente (**Figura 20**). De esta manera, se ratifica que en matrices de alta absorbancia, la aplicación de tratamientos UVC en reactores lineales en los que el espacio de la zona efectiva de tratamiento es muy reducida y el flujo es laminar, sería una buena estrategia incrementar número de pases o valor NET para aumentar la letalidad microbiana.

En este sentido, Orłowska et al. (2014) al tratar licuado de soja, con un coeficiente de absorción de $162,1 \text{ cm}^{-1}$, inoculado con una cepa de *E. coli* (subrogada de *E. coli* O157:H7) obtuvieron una reducción de 0,5 log con una dosis de $4,45 \text{ mJ/cm}^2$, tras 10 pases por el reactor con un flujo laminar. En esta tesis, con un número de pases parecido (15 pases) al aplicar el tratamiento T2, pero con una dosis final mucho más elevada (20 J/mL equivalente a $2.082,8 \text{ mJ/cm}^2$), se consiguió una letalidad de 2,47 log. La diferencia en la eficacia puede ser debida a diversos factores como la diferencia en el coeficiente de absorción de los licuados y la posible diferencia en la susceptibilidad de las cepas utilizadas. Se ha evidenciado que la cepa de *E. coli*, del presente estudio es más resistente a la radiación UVC que la cepa patógena O157:H7, y posiblemente de su subrogado (Murakami et al. 2006).

Son varios los estudios de evaluación del efecto de los tratamientos UVC en la letalidad en *E. coli* realizados con reactores diferentes y con cepas distintas. Uno de ellos se realizó con la misma cepa de esta tesis, pero con un reactor de tubo en espiral de diferentes diámetros internos (1,6 mm y 3,2 mm) (Choudhary et al. 2011). En este caso, se consiguió las mayores letalidades con el reactor de menor diámetro interno (4,1 log) en leche cruda de vaca, con un número Reynolds (Re) de 713 (tasa de flujo de $3,3 \text{ mL/s}$) y en leche de vaca desnatada de 7,8 log con un Re de 532 (tasa de flujo de $1,7 \text{ mL/s}$), en ambos casos a una dosis de 11.187 mJ/cm^2 . También, Lu et al. (2011) estudiaron el efecto de utilizar reactores con distinto diámetro interno (1,5 mm, 2 mm, 3 mm), con un flujo con un Re superior a 2.500 y con una cepa de *E. coli* distinta a la de esta tesis. Los resultados de letalidad obtenidos en leche UHT entera fueron superiores a 6 log con diámetros de 1,5 mm y 2 mm a una dosis de $20,8 \text{ mJ/cm}^2$ y 20,5 pases, mientras que con el diámetro a 3 mm la reducción fue de solo 4 log. Sin embargo, en el licuado de soja del presente estudio, para sobrepasar los 6 log de reducción, fue necesario aplicar

una dosis mucho mayor, 160 J/mL (16.646 mJ/ cm²), utilizando un reactor con un diámetro interno inferior (1 mm) (**Figura 21**), si bien hay que considerar que se desconoce el coeficiente de absorción de la leche y que la cepa de *E. coli* era más resistente (Murakami et al. 2006) que la utilizada en el estudio de Lu et al. (2011).

En otras investigaciones realizadas tratando por UVC leche, con cepas de *E. coli* O157:H7, Matak, (2004), determinó que en leche desnatada (0% en grasa), semidesnatada (2% en grasa) y entera (3,25% en grasa) inoculada con una cepa subrogada de *E. coli* O157:H7 (ATCC 25922), se conseguían letalidades de 2,27, 1,43 y 1,44, respectivamente, al aplicar dosis de sólo 5,8 mJ/ cm². Crook et al. (2015), consiguieron letalidades de 5 log con una dosis de 1,50 J/mL, aunque con un valor de Re superior a 7.500. Finalmente, Yin et al. (2015) evaluó el comportamiento de *E. coli* O157:H7 irradiándola en una placa de Petri con la tapa abierta con 15,9 mJ/cm², consiguiendo una reducción de 2,95 log en leche entera pasteurizada (coeficiente de absorción de 476,2 cm⁻¹). Así según estos resultados, cabe suponer que las cepas de *E. coli* O157:H7 serían más sensibles que las cepas *E. coli* K12 o análogas utilizadas habitualmente en los estudios de radiación UVC ya que se precisan dosis menores para lograr una mayor inactivación (Choudhary et al. 2011; Bandla et al. 2012).

10. Efecto de los tratamientos UVC sobre *L. monocytogenes* en té verde y licuado de soja

10.1. Té verde

La letalidad producida por el efecto del tratamiento UVC no se pudo determinar, debido a que la propia matriz tuvo un efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*. De forma que, aunque el nivel inicial de inoculación de *L. monocytogenes* fue de 10⁸ UFC/mL, los recuentos obtenidos en la muestra control (sin tratamiento UVC) fueron de tan solo 10² UFC/mL, por lo que al aplicar incluso tratamientos a la mínima dosis de UVC (10 J/mL) se consiguió la letalidad completa, con recuentos por debajo del límite de detección (1 UFC/mL).

10.2. Licuado de soja

Los diferentes tratamientos con radiación UVC ensayados para estudiar la letalidad de *L. monocytogenes* se resumen en la **Figura 24**. Se observó que, al igual que se pudo ver

con los otros microorganismos, los tratamientos T1 no alcanzaron 1 log de reducción, no observándose diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en ninguna de las dosis aplicadas. En los tratamientos T2 y T3, la letalidad fue considerable ($>$ de 3 log) a dosis de 20 J/mL, para posteriormente aumentar gradualmente hasta sobrepasar los 5 log en el tratamiento T3 a una dosis de 80 J/mL y de 160 J/mL en el T2. La máxima letalidad (6,68 log) se alcanzó con el tratamiento T3 a 160 J/mL.

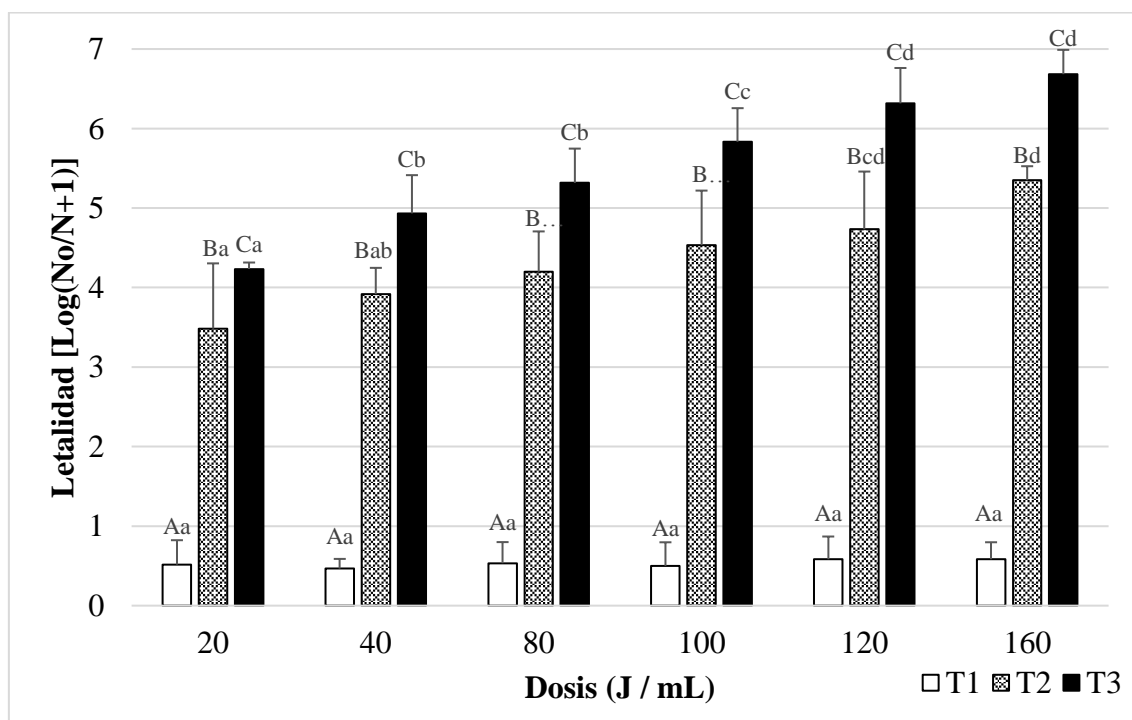


Figura 24: Niveles de reducción de los recuentos de *L. monocytogenes* inoculado en licuado de soja causados por diferentes tratamientos de radiación ultravioleta consistentes en diferentes dosis (J/mL) y número de pases (T1, T2 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con el mismo número de pases (T) pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos con diferente número de pases pero igual dosis de UVC.

11. Discusión sobre el efecto de los tratamientos UVC sobre *L. monocytogenes*

Hasta la fecha, no hay estudios del efecto de los tratamientos UVC sobre *L. monocytogenes* inoculada en licuado soja, aunque sí en matrices de coeficiente de absorción elevado, como la leche o la horchata, siendo determinante en la letalidad obtenida no solo el tipo de matriz, sino también el diseño del reactor y el número de pases. Por una parte, Matak et al. (2005) obtuvieron una elevada letalidad (5,62 log) en leche fresca entera de cabra tratada con una dosis acumulada de 15,8 mJ/cm², después de 12 pases por el reactor con un Reynolds alto (5.187). La misma letalidad, fue conseguida en leche entera por Crook et al. (2015) con dosis de solo 2 J/mL y con un de Re superior a 7.500. Sin embargo, con flujos con un valor Reynolds inferiores, Lu et al. (2011) y Pereira et al. (2014) obtuvieron letalidades inferiores a los 4 log de reducción en leche entera de vaca con unas dosis de radiación UVC totales de 21,7 mJ/cm², tras 20 pases, a un valor Re de 2500 en el primer estudio, y una dosis de 1.350 mJ/cm² tras 120 pases en el segundo. De forma que, si se compara con los resultados obtenidos en este trabajo se observa que para poder lograr una letalidad entorno a 5 log de *L. monocytogenes* la dosis necesaria fue de 40 J/mL (4.165,5 mJ/cm²) con el tratamiento T3. Una posible explicación de esta gran diferencia de efectividad, aparte del diseño del reactor, podrían ser las diferencias en los coeficientes de absorción de las diferentes matrices, aunque dicha información no está disponible en los trabajos anteriormente mencionados.

Elbrhami, (2016) evaluó los efectos de tratamientos UVC en *Listeria innocua* inoculada en horchata, matriz de características similares al licuado de soja de este estudio por ser un licuado vegetal, aunque con un coeficiente de absorción mucho menor (193 cm⁻¹). En su caso, la letalidad obtenida para *L. innocua* ATCC 51742 fue de 5 log tras aplicar una dosis de tan solo 17,9 J/mL mediante 5 ciclos o pases (Elbrhami, 2016), resultados que serían similares a los obtenidos en este estudio con el tratamiento T3 a 20 J/ml para *L. monocytogenes*, en el que la letalidad obtenida fue de 4,25 log.

Respecto al té verde, como se comentó anteriormente, no se pudo evaluar el efecto del tratamiento UVC. La misma matriz tuvo un efecto inhibitor e incluso letal sobre *L. monocytogenes*, probablemente debido ciertos componentes del té. Este efecto inhibitor sobre *L. monocytogenes* también fue observado por Mora et al. (2013) donde el 10% de las infusiones de té verde ensayadas, que contenían 1,05 mg/mL de compuestos

fenólicos totales, mostraron un efecto inhibitor respecto a *L. monocytogenes*, *E. coli* y *A. niger*, aunque en este trabajo no se observaron estos efectos en las cepas de *E. coli* y *A. niger* ensayadas.

Los compuestos responsables de esta reducción podrían ser los polifenoles, en concreto las catequinas, un subgrupo de los flavan-3-oles presente en un 30-40% del peso seco de las hojas de té verde fresco (Graham, 1992), y en particular a los compuestos epigallocatequina-3-galato (EGCG) y el epicatequina-3-galato (ECG). Aunque el contenido de estas sustancias depende de varios factores, como pueden ser la localización del cultivo, condiciones ambientales y meteorológicas, la nutrición de la planta, así como de su procesado. En porcentaje, el perfil típico de una hoja de té verde en cuanto al contenido de catequinas se puede establecer entre un 10–15% de EGCG y un 6–10% de EGC (Vuong et al. 2011), siendo su contenido superior al del té negro y el té Oolong o el Pu-erh (Bansal et al. 2013).

Los compuestos EGCG y ECG crean un complejo que pueden dañar la membrana celular bacteriana, causando una fuerte inhibición en *L. monocytogenes* (Patar, Tanaka y Maeda, 2003; Mbata, 2008; Mora et al., 2013). Du et al. (2018) estudiaron la actividad antimicrobiana del EGCG y su eficacia para inhibir las formaciones de biofilms, determinado que la concentración inhibitoria mínima (MIC) de EGCG para *L. monocytogenes* era de 200 mg/mL. Además, algunas hipótesis sugieren que las catequinas se unen con peptidoglicanos e interfieren en la síntesis de la pared, esta unión es específica del peptidoglicano de las bacterias Gram positivas y no del lipopolisacárido de las Gram negativas (Shimamura, Zhao y Hu, 2007), de esta manera se explica que el efecto antimicrobiano sea más eficaz en *L. monocytogenes* y no en *E. coli* o los microorganismos esporulados. Otras teorías indican que la acción bactericida de las catequinas también depende de la generación de peróxido de hidrógeno a partir de reacciones entre catequinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), que se pueden producir durante el tratamiento de radiación UVC (Gopal et al. 2016).

12. Efecto de los tratamientos UVC en los microorganismos en función de la matriz tratada: té verde y licuado de soja

La resistencia de los microorganismos a los tratamientos UVC aplicados en función de la matriz se muestra en la **Tabla 18**. Como se puede observar, la susceptibilidad a los tratamientos UVC fue muy similar en ambas matrices, a excepción del tratamiento T1. *A. niger* fue el microorganismo que mostró una resistencia significativamente mayor en ambas matrices ($p < 0,05$) en los tratamientos T3, seguido de *B. subtilis* y por último *E. coli*. En el caso de los tratamientos T2, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre *A. niger* y *B. subtilis*, aunque sí entre estos y *E. coli* y, además, en el caso del licuado de soja con *L. monocytogenes*. En el tratamiento T1 en el té verde el perfil de resistencia fue similar al obtenido en T3, sin embargo en el licuado de soja no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre *B. subtilis*, *A. niger* y *L. monocytogenes*, aunque sí respecto a *E. coli*.

Tabla 18: Resistencia de los diferentes microorganismos inoculados en té verde y licuado de soja a los tratamientos de UVC.

	Té verde	Licuado de soja
Tratamiento 1	<i>A. niger</i> > <i>B. subtilis</i> > <i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> = <i>A. niger</i> = <i>L. monocytogenes</i> > <i>E. coli</i>
Tratamiento 2	<i>A. niger</i> = <i>B. subtilis</i> > <i>E. coli</i>	<i>A. niger</i> = <i>B. subtilis</i> > <i>E. coli</i> > <i>L. monocytogenes</i>
Tratamiento 3	<i>A. niger</i> > <i>B. subtilis</i> > <i>E. coli</i>	<i>A. niger</i> > <i>B. subtilis</i> > <i>E. coli</i> > <i>L. monocytogenes</i>

La alta resistencia de *A. niger* mostrada durante los tratamientos de UVC puede ser causada por la capacidad del microorganismo de elaborar pigmentos de melanina, que dificultarían la penetración de la radiación UVC en la espora y la afectación del material genético del microorganismo, aumentando su supervivencia (Jun et al. 2003; Begum et

al. 2009; Esbelin et al. 2013).

Las células vegetativas de *E. coli* y *L. monocytogenes* mostraron una sensibilidad significativamente mayor que los microorganismos esporulados, y además, *E. coli* mostró, en general, una resistencia mayor que *L. monocytogenes* a la radiación UVC. Estos resultados son relativamente diferentes a lo obtenido por otros autores (Koutchma et al. 2009; Lu et al. 2011; Pereira et al. 2014; Crook et al. 2015), que observaron que las bacterias Gram positivas, como *L. monocytogenes*, muestran una mayor resistencia respecto las bacterias Gram negativas, como *E. coli*. Posiblemente, sea debido a que la cepa de *E. coli* empleada en este estudio está relacionada con la cepa de *E. coli* K12, que tiene una elevada resistencia a la radiación UVC (Bandla et al. 2012).

13. Modelización matemática de los tratamientos UVC

Considerando los resultados obtenidos tras los tratamientos UVC en las diferentes matrices, puede ser relevante modelizar la letalidad de los microorganismos en el equipo utilizado en este estudio. De esta manera, se puede crear un modelo de predicción de letalidad microbiana específico ajustado, en el que los valores predichos se acerquen lo máximo posible a los datos observados. Para ello, se han elaborado cinco modelos de regresión lineal o cuadrática, a partir de las variables o factores que puedan ser determinantes para explicar la letalidad microbiana. Entre estas variables podemos encontrar la dosis, el caudal y el valor NET (o número de entradas en el reactor) y como covariable la concentración inicial del microorganismo (Log_c). Como resultado de la combinación o interacción de estos se han evaluado cinco modelos: 1) Modelo 1: Dosis-caudal lineal; 2) NET lineal; 3) NET cuadrático; 4) Dosis-caudal-NET lineal y 5) Dosis-caudal- NET cuadrático (**Tabla 19**). Para determinar el modelo en el que los valores predichos se acerquen lo máximo posible a los datos observados, se tuvieron en consideración diferentes parámetros estadísticos, priorizando: 1) el R^2 ajustado que se acerque lo más posible a 1, ya que nos indicaría que la predicción del modelo se acerca a lo observado, 2) la raíz cuadrada del error cuadrático medio o RSME, la cual indica el ajuste absoluto del modelo a los datos; cuanto más bajo sea el valor RSME mejor será el ajuste ya que la discrepancia entre los datos será menor y 3) por último, como criterio más subjetivo y con la finalidad de facilitar la aplicación del modelo, se seleccionó el modelo en el que el número de variables fuera más reducido. Los modelos seleccionados se resaltan en negrita en la **Tabla 19 y 20**.

Un ejemplo de elección podría ser en el caso de las conidiosporas de *A. niger* inoculadas en licuado de soja (**Tabla 19**). En este caso, el modelo elegido fue el 3 ya que la R^2 es 0,96 y el RSME 0,31 con las 3 variables propuestas (Log_c, NET y NET²), mientras que al añadir las variables explicativas Dosis y Caudal (modelo 5) el R^2 ajustado solo mejora 0,01 y el RSME 0,05. Por lo tanto, en este caso se ha optado por elegir el modelo con menos variables explicativas para así facilitar su uso.

De manera general, en los modelos estudiados, se puede ver que el número de pases o valor NET es el factor que tiene más relevancia, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a la dosis aplicada. Por lo tanto, en este caso, la dosis aplicada no juega un papel determinante en cuanto a la letalidad conseguida en los diferentes tratamientos UVC.

Tabla 19: Diferentes modelos matemáticos en función de la letalidad obtenida en las diferentes matrices después de los tratamientos llevados a cabo con el equipo de radiación UVC. Los datos destacados en negrita, representa el mejor ajuste para cada uno de los microorganismos y matrices testadas.

Matriz	Microorganismo	Modelo 1*		Modelo 2**		Modelo 3***		Modelo 4****		Modelo 5*****	
		R ²	RSME	R ²	RSME	R ²	RSME	R ²	RSME	R ²	RSME
Licuado de soja	<i>B. subtilis</i>	0,88	0,62	0,93	0,46	0,95	0,39	0,95	0,40	0,96	0,37
	<i>A. niger</i>	0,80	0,72	0,94	0,40	0,96	0,31	0,96	0,41	0,97	0,26
	<i>E. coli</i>	0,87	0,62	0,82	0,74	0,85	0,67	0,92	0,51	0,92	0,51
	<i>L. monocytogenes</i>	0,94	0,58	0,75	1,13	0,85	0,90	0,95	0,50	0,96	0,46
Té verde	<i>B. subtilis</i>	0,74	0,49	0,45	0,71	0,45	0,72	0,75	0,49	0,75	0,49
	<i>A. niger</i>	0,90	0,44	0,61	0,84	0,85	0,80	0,90	0,44	0,93	0,36
	<i>E. coli</i>	0,68	0,79	0,35	1,11	0,42	1,06	0,76	0,68	0,79	0,64
Leche entera	<i>B. subtilis</i>	0,83	0,70	0,83	0,69	0,94	0,40	0,86	0,63	0,94	0,40
Leche destada	<i>B. subtilis</i>	0,91	0,52	0,90	0,53	0,95	0,36	0,92	0,48	0,96	0,34

* Modelo 1 (lineal): Letalidad= Constante + a · Log_c + b·Dosis + c·Caudal (Log_c: concentración inicial)

** Modelo 2 (lineal): Letalidad= Constante + a · Log_c + b·NET

*** Modelo 3 (cuadrático): Letalidad= Constante + a · Log_c + b·NET + c·NET²

**** Modelo 4 (lineal): Constante + a · Log_c + b·Dosis+ c·Caudal + d·NET

***** Modelo 5 (cuadrático): Constante + a · Log_c + b·Dosis+ c·Caudal + d·NET + e·NET²

Tabla 20: Modelos matemáticos seleccionados con sus respectivas ecuaciones para cada una de las matrices y microorganismos evaluados.

Matriz	Microorganismo	Modelo	Ecuación del modelo
Licuado de soja	<i>B. subtilis</i>	3	Letalidad= $-0,41 + 0,15 \cdot \text{Log}_c + 0,02 \cdot \text{NET} - 0,00002 \cdot \text{NET}^2$
	<i>A. niger</i>	3	Letalidad= $-3,03 + 0,69 \cdot \text{Log}_c + 0,02 \cdot \text{NET} - 0,00002 \cdot \text{NET}^2$
	<i>E. coli</i>	4	Letalidad= $-1,086 + 0,31 \cdot \text{Log}_c + 0,0011 \cdot \text{Dosis} + 0,032 \cdot \text{Caudal} + 0,0079 \cdot \text{NET}$
	<i>L. monocytogenes</i>	4	Letalidad= $-1,027 + 0,19 \cdot \text{Log}_c + 0,0018 \cdot \text{Dosis} + 0,06 \cdot \text{Caudal} + 0,0068 \cdot \text{NET}$
Té verde	<i>B. subtilis</i>	1	Letalidad= $-0,739 + 0,342 \cdot \text{Log}_c + 0,016 \cdot \text{Dosis} + 0,007 \cdot \text{Caudal}$
	<i>A. niger</i>	5	Letalidad= $-6,62 + 1,23 \cdot \text{Log}_c + 0,022 \cdot \text{Dosis} + 0,019 \cdot \text{Caudal} + 0,008 \cdot \text{NET} - 0,00003 \cdot \text{NET}^2$
	<i>E. coli</i>	4	Letalidad= $6,24 - 0,79 \cdot \text{Log}_c + 0,029 \cdot \text{Dosis} + 0,057 \cdot \text{Caudal} - 0,00833 \cdot \text{NET}$
Leche entera	<i>B. subtilis</i>	3	Letalidad= $6,557 - 1,002 \cdot \text{Log}_c + 0,029 \cdot \text{NET} - 0,00005 \cdot \text{NET}^2$
Leche desnatada	<i>B. subtilis</i>	3	Letalidad= $-4,2 + 0,97 \cdot \text{Log}_c + 0,023 \cdot \text{NET} - 0,00004 \cdot \text{NET}^2$

14. Cinéticas de inactivación y cálculo del valor $4D_{UV}$ para los diferentes tratamientos UVC

Adicionalmente a la determinación de los modelos matemáticos de inactivación evaluados anteriormente, se determinó la cinética en función de los tratamientos aplicados (T1, T2 y T3) y la dosis. Para elegir los modelos con mejor precisión de ajuste se utilizaron las mismas variables que en la modelización matemática (véase Resultados y Discusión apartado 13); en base al error cuadrático medio (RMSE) y el valor R^2 (**Tabla 21**). En el caso de los tratamientos T1 con las matrices de elevado coeficiente de absorción (leche entera, desnatada y licuado de soja) el efecto del tratamiento fue mínimo por lo tanto el ajuste del modelo no fue bueno (**Tabla 21**), por lo tanto no se han incluido las cinéticas de inactivación en el presente estudio.

De manera general, la constante de inactivación se utiliza para evaluar la susceptibilidad de un microorganismo a la radiación UVC. Este puede ser un buen indicador siempre que la cinética de inactivación del microorganismo sea lineal; en este caso, la cinética presentará solo una constante de inactivación (k). Debido a la aparición de colas u hombros, en la mayoría de los casos las cinéticas de inactivación constan de dos constantes de inactivación. En el presente estudio, todos los tratamientos T2 y T3 en todas las matrices y microorganismos, y en los T1 en té verde se obtuvieron cinéticas no lineales. La presencia de hombros en las curvas indica que, al inicio del tratamiento, no se observa una disminución del microorganismo tratado a pesar de ir aumentando de dosis. Por lo contrario, la aparición de colas indica que a cierta dosis, por mucho que ésta aumente siempre se observará una población más resistente. Este último caso, la aparición de colas, es el modelo principal observado (**Tabla 21** y **Figuras 25-27**). En concreto, las matrices de alta y media absorbancia inoculadas con esporas de *B. subtilis* se ajustaron a un modelo de Weibull con cola. Este fenómeno nos indica que a partir de 40 J/mL u 80 J/mL, existe una desaceleración en la velocidad de la inactivación de las esporas, de forma que al aplicar dosis más elevadas como 100, 120 o 160 J/mL, la población no disminuye con la misma constante de inactivación que presentan las dosis inferiores.

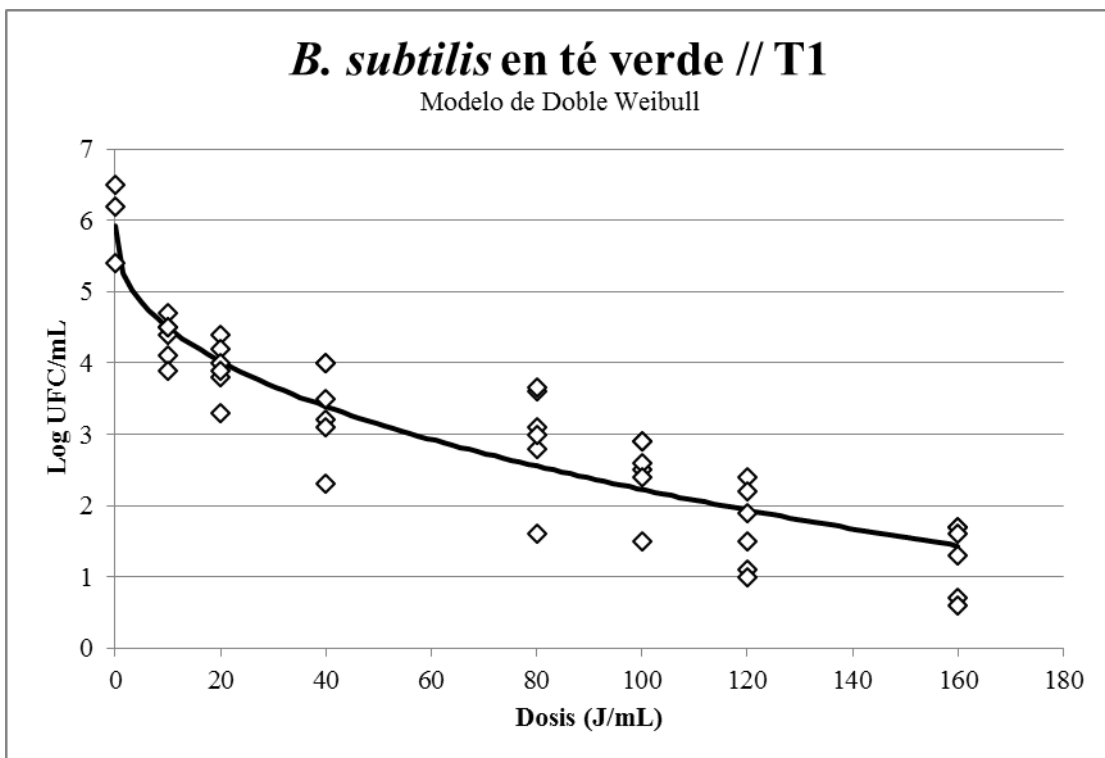
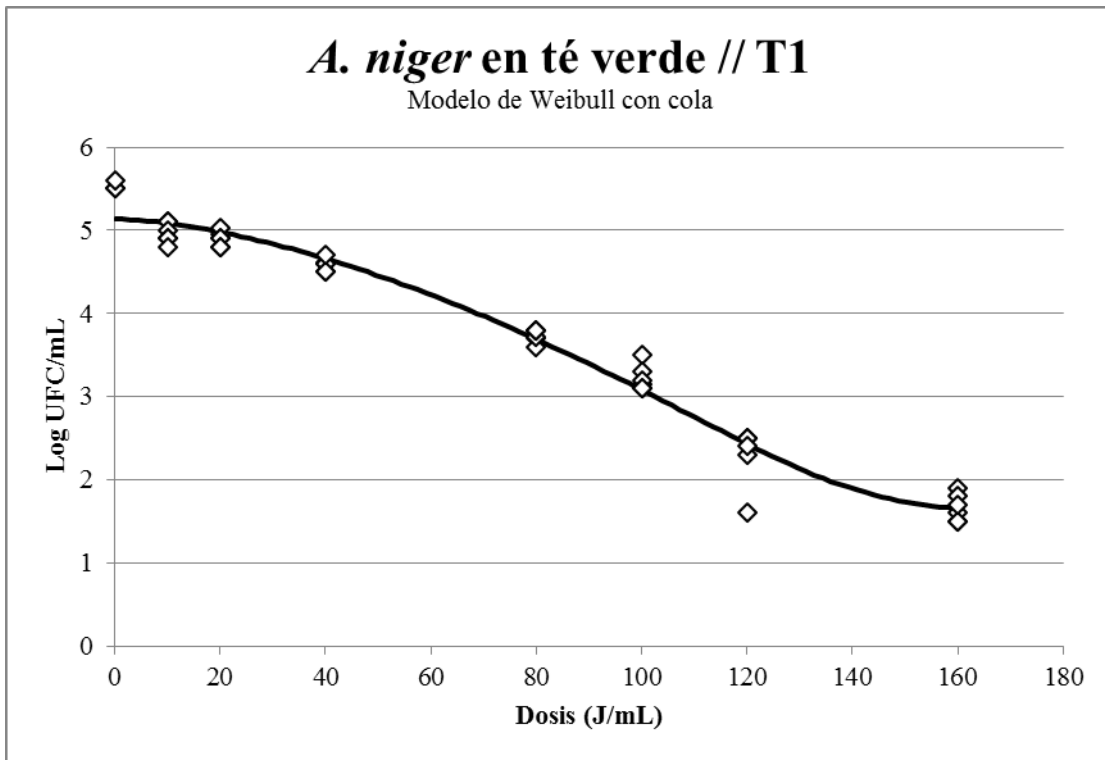
Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la cinética de inactivación microbiana no corresponde a un modelo lineal y por lo tanto, el cálculo del valor D_{uv} o tiempo necesario para reducir la población microbiana una unidad logarítmica, puede ocasionar estimaciones alejadas de la realidad. El cálculo de este valor puede ser de gran importancia para poder caracterizar la dosis necesaria para inactivar un valor concreto de carga microbiana y poder extrapolar estos resultados a escalas industriales. De modo que, es muy importante aplicar la cinética adecuada en cada caso y utilizar modelos con un buen ajuste para así no sobreestimar la capacidad de inactivación del sistema. Los valores obtenidos en este estudio se presentan en la **Tabla 21**.

En este estudio no se ha podido calcular el valor D_{uv} debido a que este solo se limita a cinéticas lineales, sí se pudo calcular mediante el software GinaFiT, el valor de 4D el cual aplica a las curvas de supervivencia lineal y no lineal (**Tabla 21**). En los tratamientos T1 con las matrices leche entera, desnatada y licuado de soja debido a que la precisión del ajuste no era buena y tampoco se alcanzaban reducciones de 4D, no se han presentado los valores correspondientes.

Algunos autores han reportado diferentes valores D_{uv} para la inactivación de *E. coli* y *L. monocytogenes* en matrices de absorbancias elevadas (Orlowska et al. 2013; Crook et al. 2015; Elbrhami, 2016). Crook et al. (2015) obtuvieron un valor D_{uv} de 0,73 J/mL para *L. monocytogenes* en leche de vaca. Comparado con los resultados del valor D_{uv} para este mismo microorganismo inoculado en licuado de soja con tratamientos UVC T2 y T3, fue de 14,4 y 4,8 J/mL, respectivamente. Para el caso de *E. coli* en leche, Crook et al. (2015) detrmnaron un valor D_{uv} más bajo, 0,55 J/mL, mientras que en este estudio, los valores obtenidos en licuado de soja con tratamientos UVC T2 y T3, fueron también considerablemente más altos, 31,6 y 12,4 J/mL, respectivamente. Este hecho, también se corrobora, al comparar los resultados de la presente tesis con los obtenidos por Orlowska et al. (2014) en licuado de soja y de Elbrhami (2016) en horchata. En licuado de soja el valor D_{uv} calculado para *E. coli* fue 6,71 mJ/cm² y para horchata de 3 mJ/cm² para *E. coli* y *L. monocytogenes*, mientras que en esta tesis fueron para *E. coli* de 3.280 y 1.312 mJ/cm² para los tratamientos T2 y T3, respectivamente y para *L. monocytogenes* de 1.476 y 492 mJ/cm². Por el contrario, en las esporas de *B. subtilis*, solo hay estudios realizados en tampón fosfato (Hoyer, 2000; Nicholson y Galeano, 2003), quienes calcularon un valor D_{uv} de 120.000 mJ/cm², mientras que en el té verde,

se obtuvieron valores inferiores de 36.000 y 17.200 mJ/cm² para los tratamientos T2 y T3, respectivamente.

Estos resultados demuestran la dificultad de poder llegar a un valor D_{uv} aplicable para cada uno de los microorganismos, matrices y con reactores diferentes. Debido a las variables que hay que tener en consideración durante el tratamiento (**Figura 6**) y las diferentes cinéticas que pueden presentar los microorganismos al tratarse con UVC, la comparación de los valores D_{uv} entre estudios no parece ser una herramienta útil para la comparación de tratamientos UVC como sí lo es para los tratamientos térmicos.



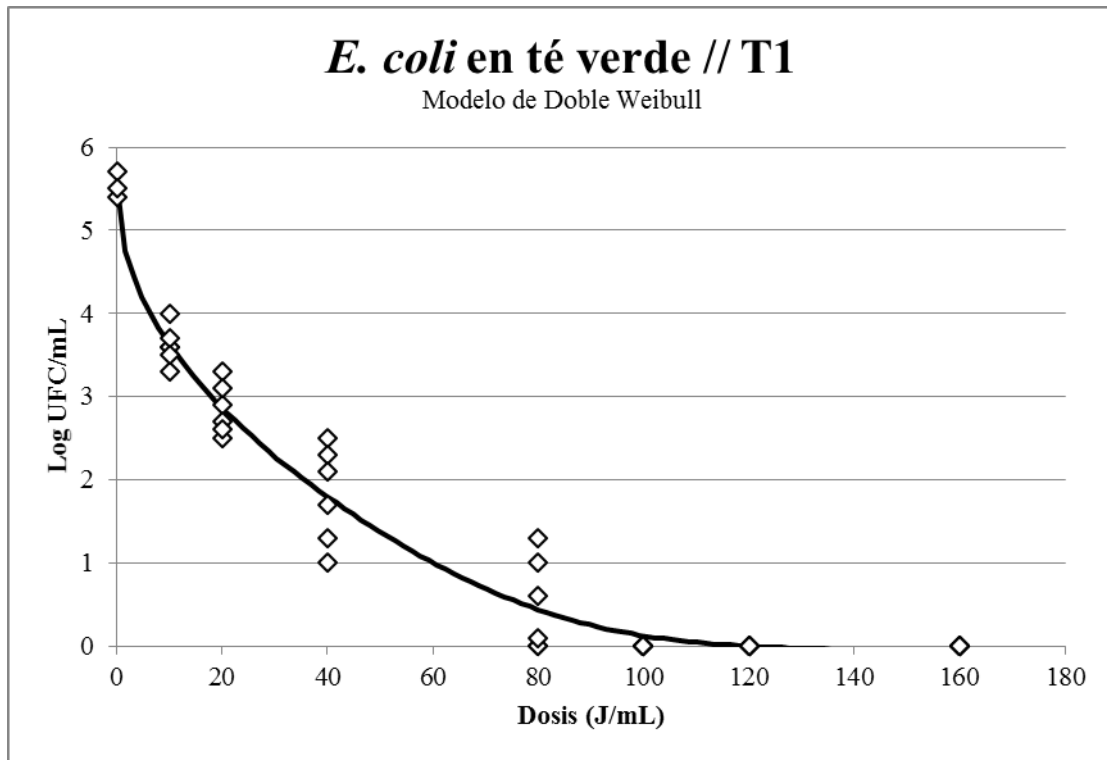
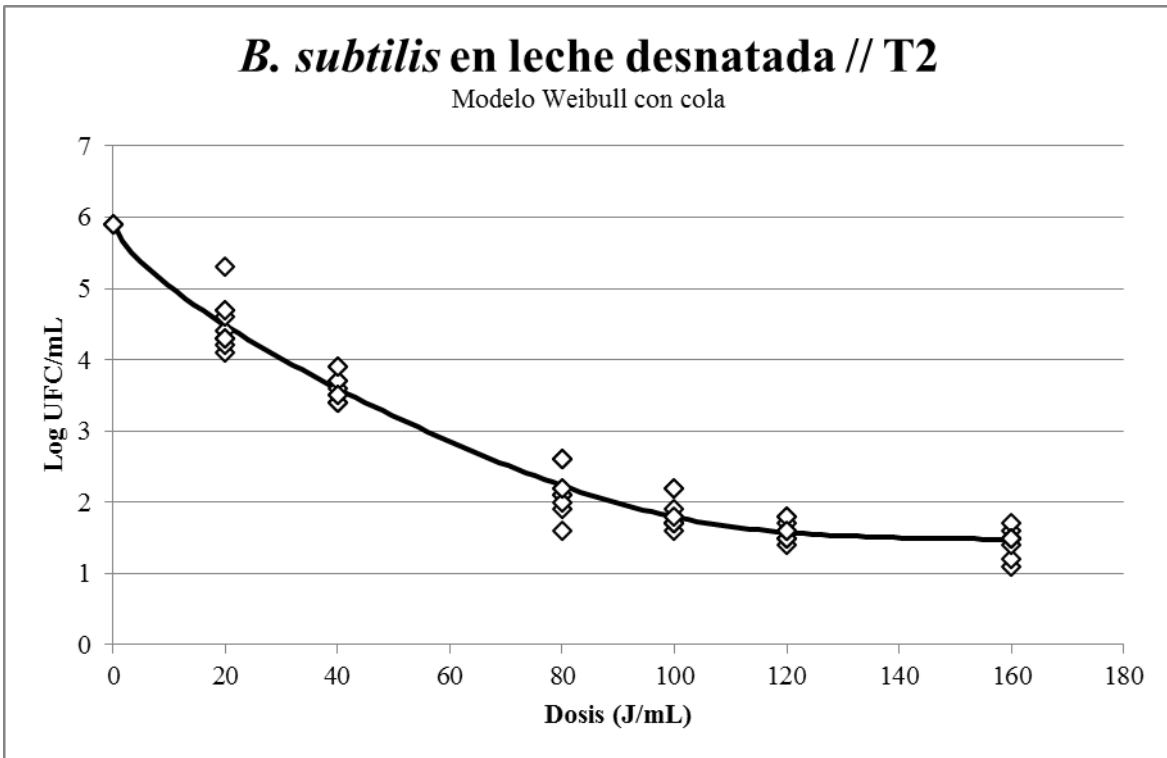
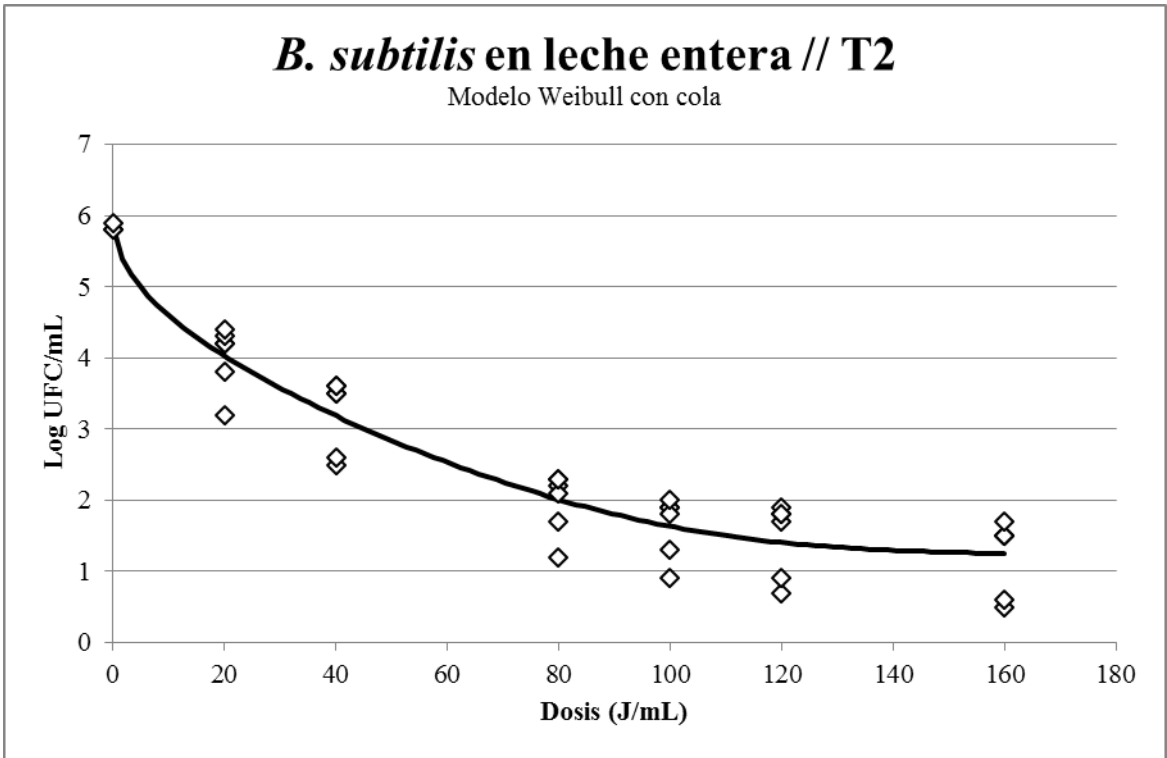
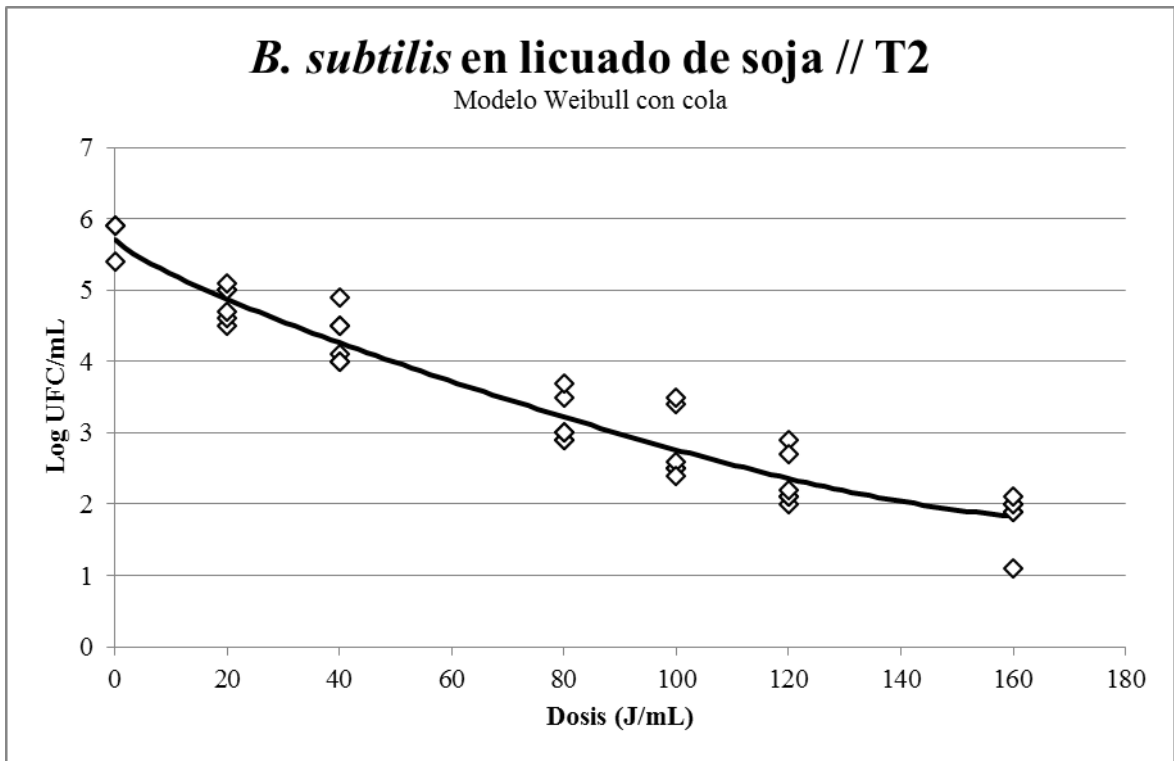
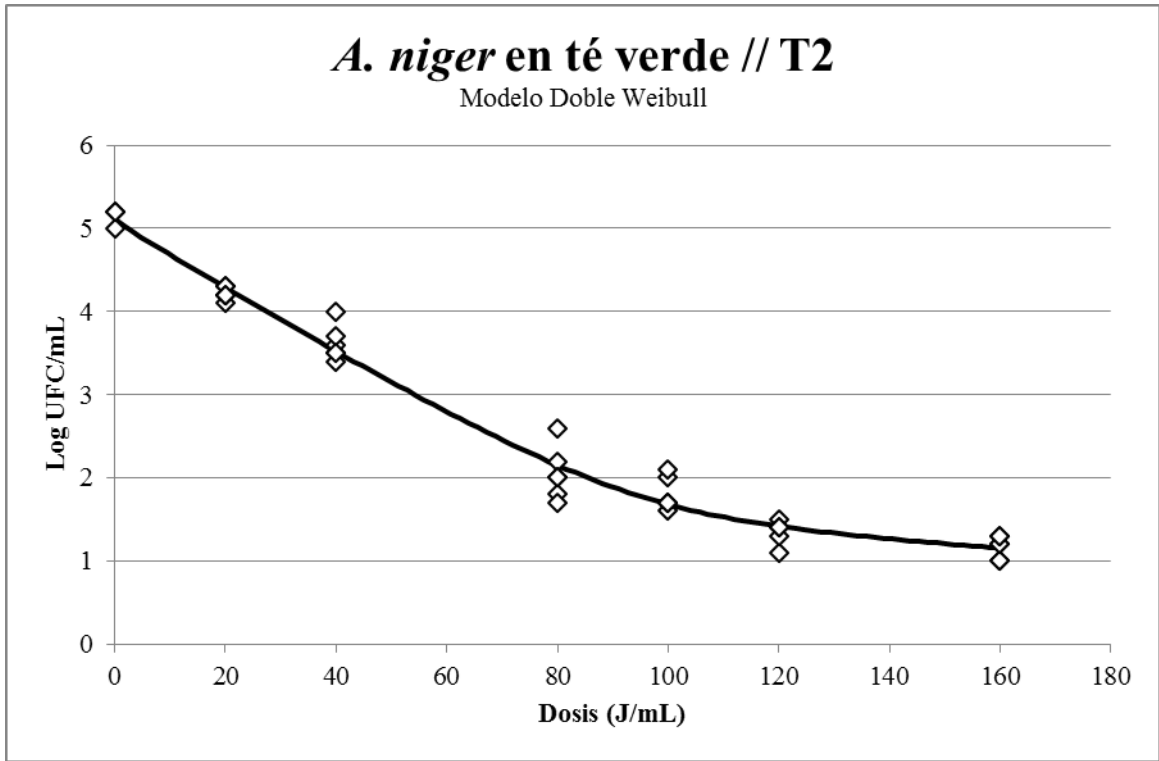
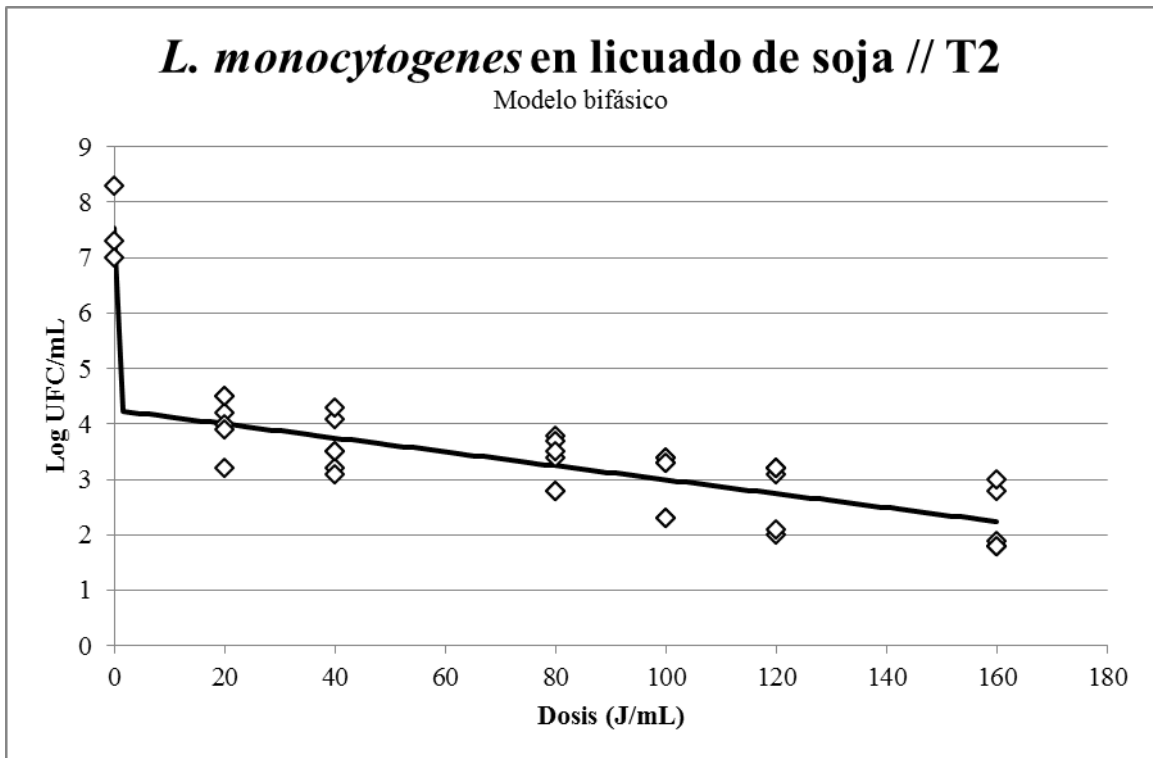
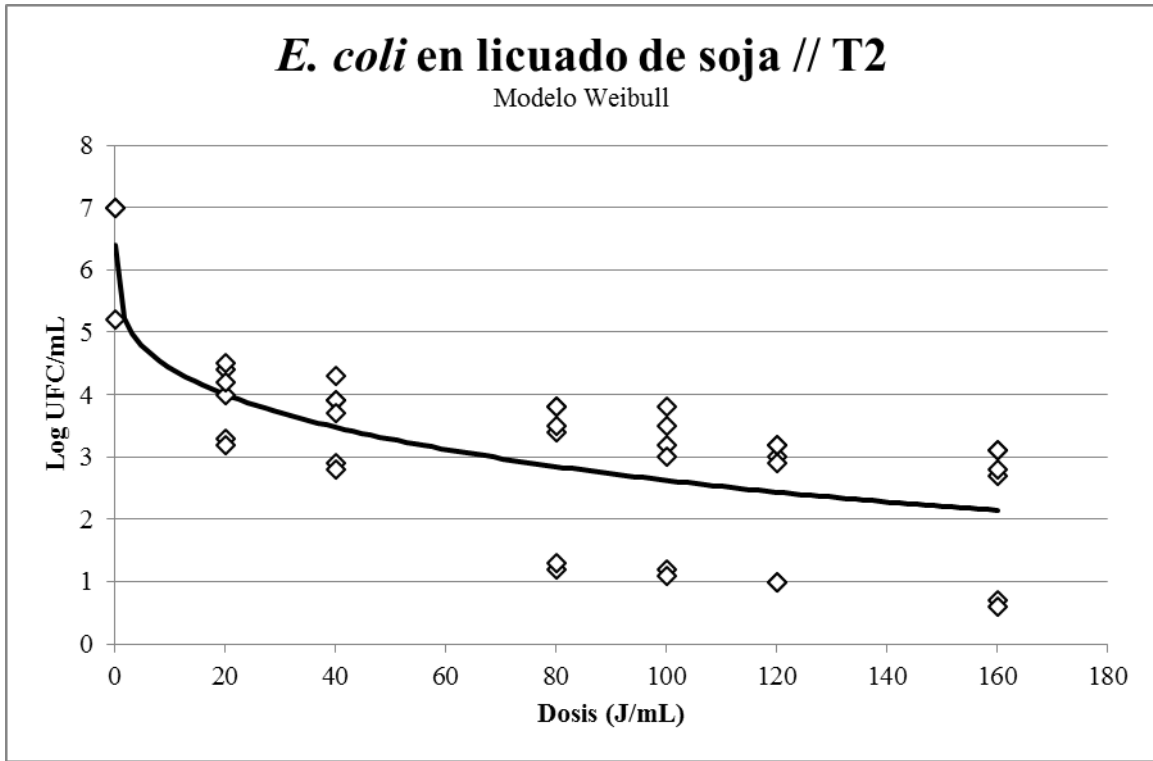
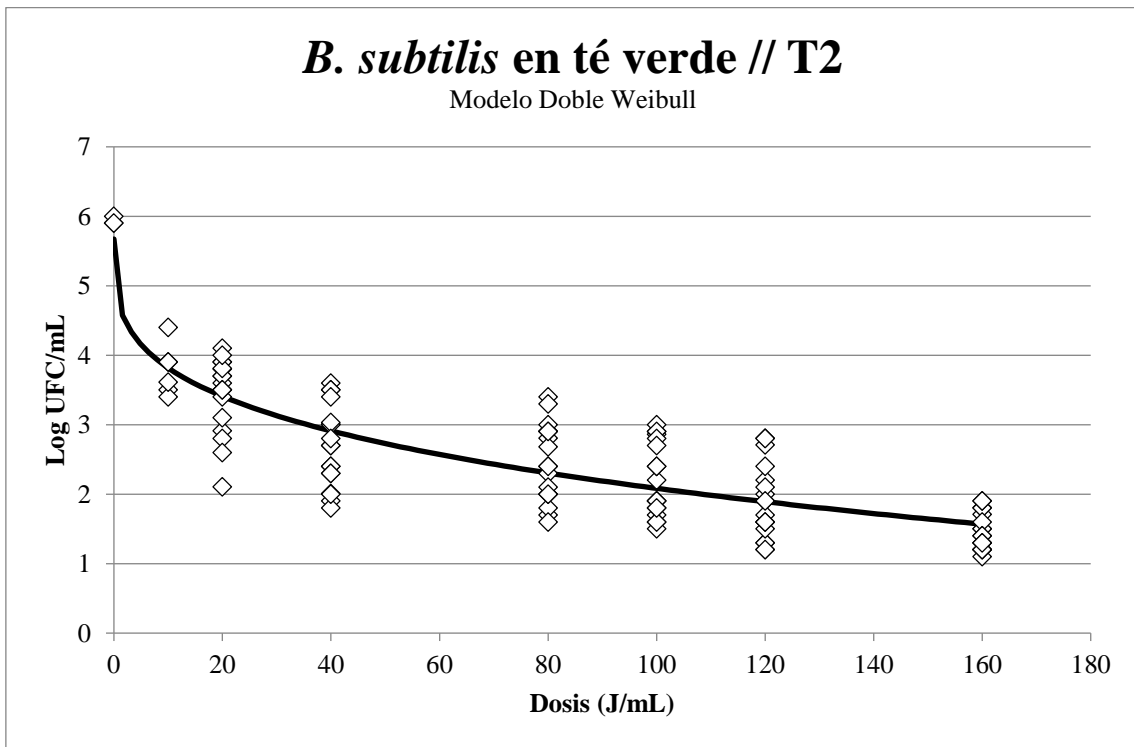
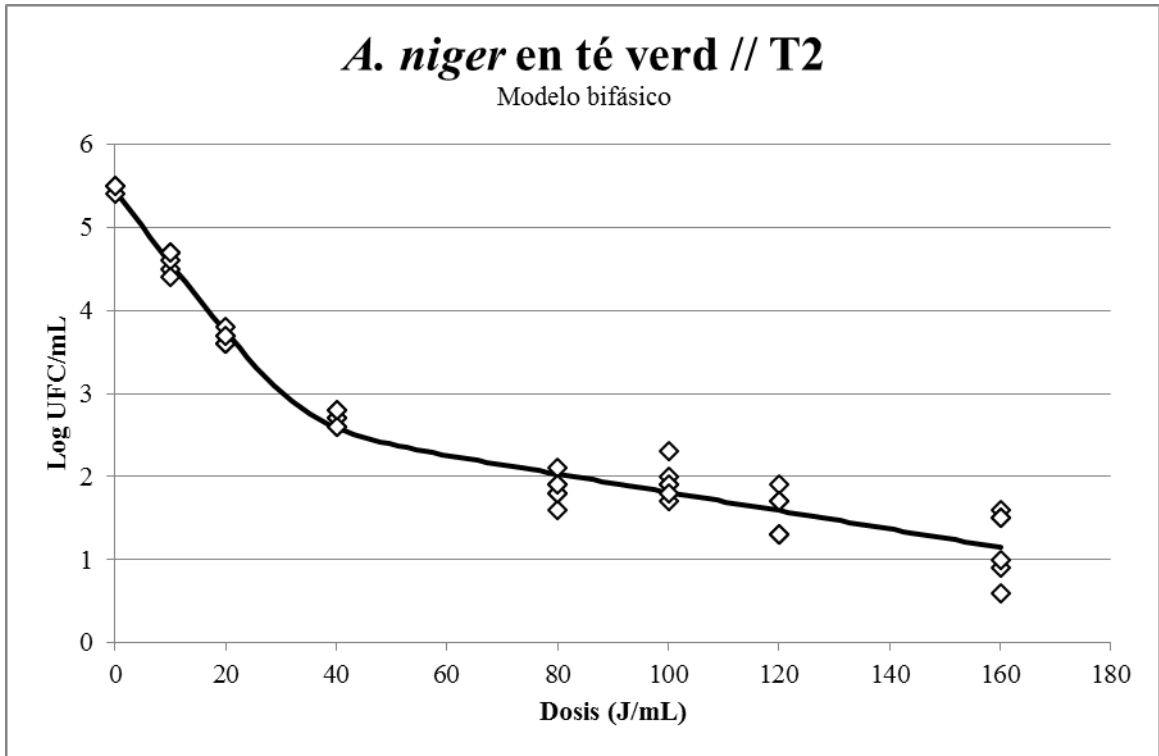


Figura 25: Valores de supervivencia observados (\diamond) de diferentes microorganismos después de la irradiación con UVC del tratamiento 1 (T1) con diferentes dosis en las matrices estudiadas. La línea negra representa la curva calculada según el modelo con el mejor ajuste en cada uno de los casos.









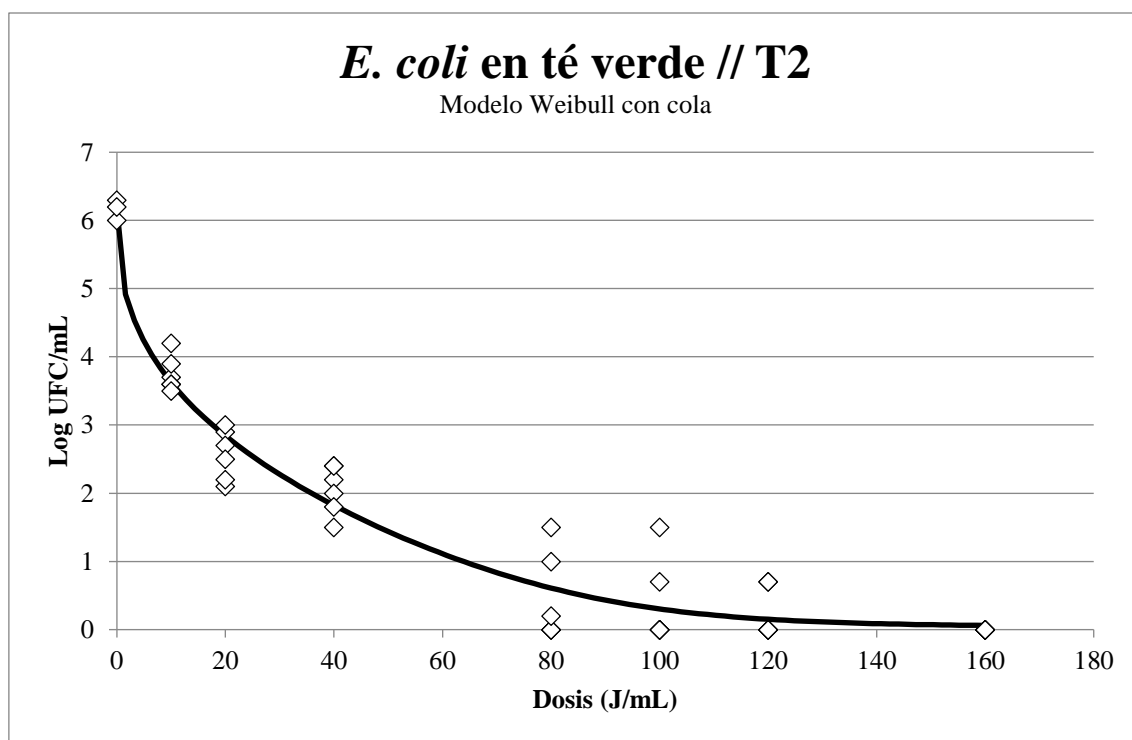
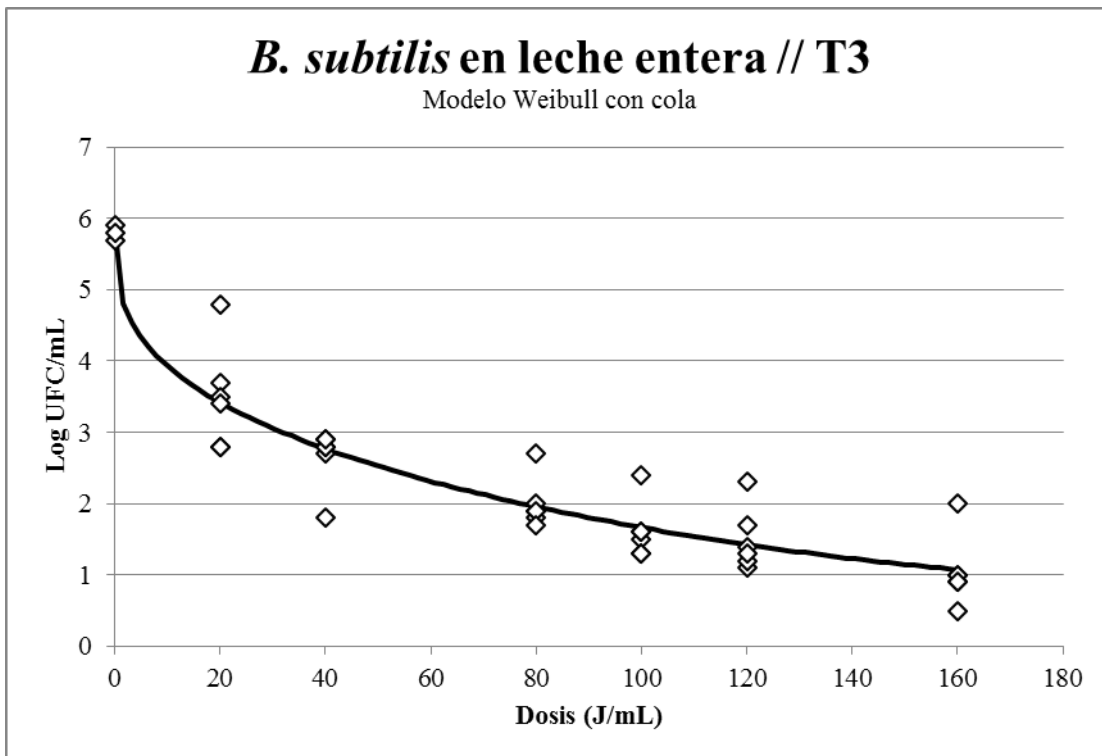
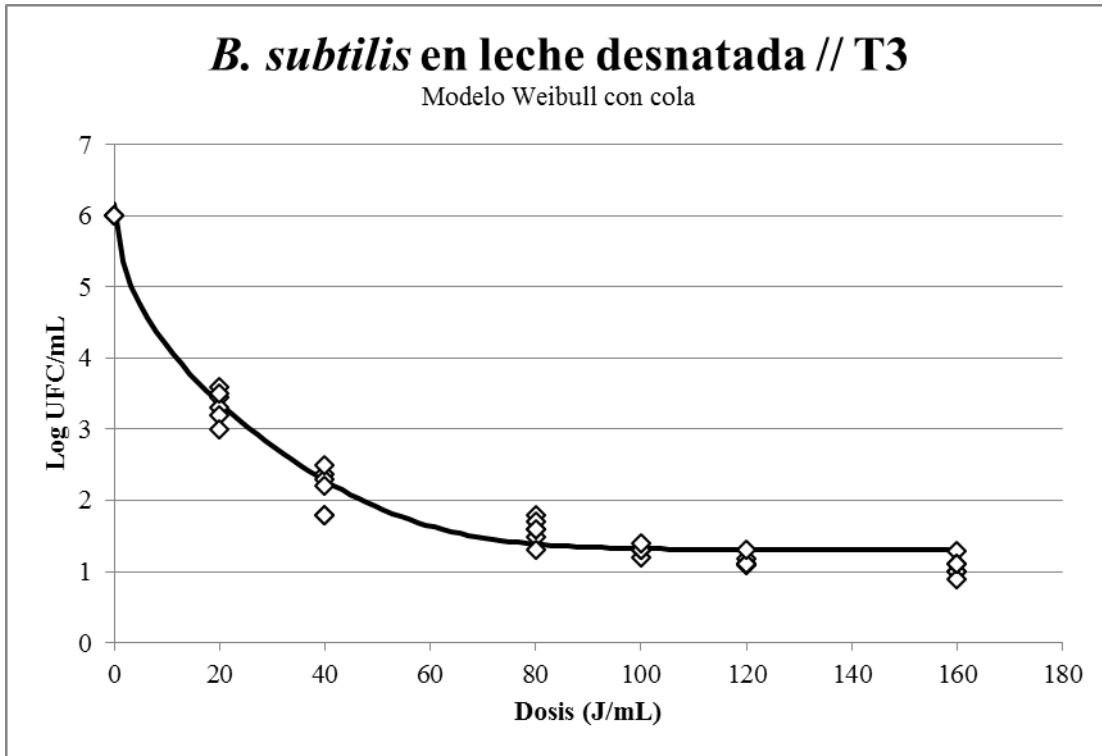
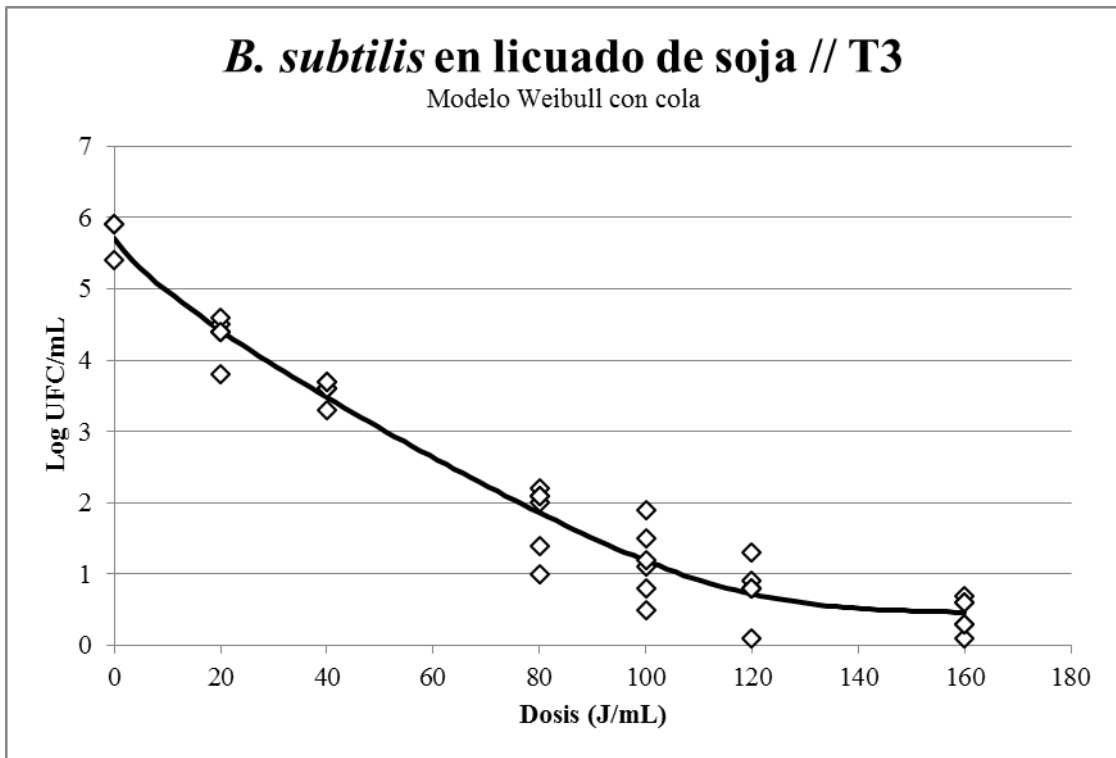
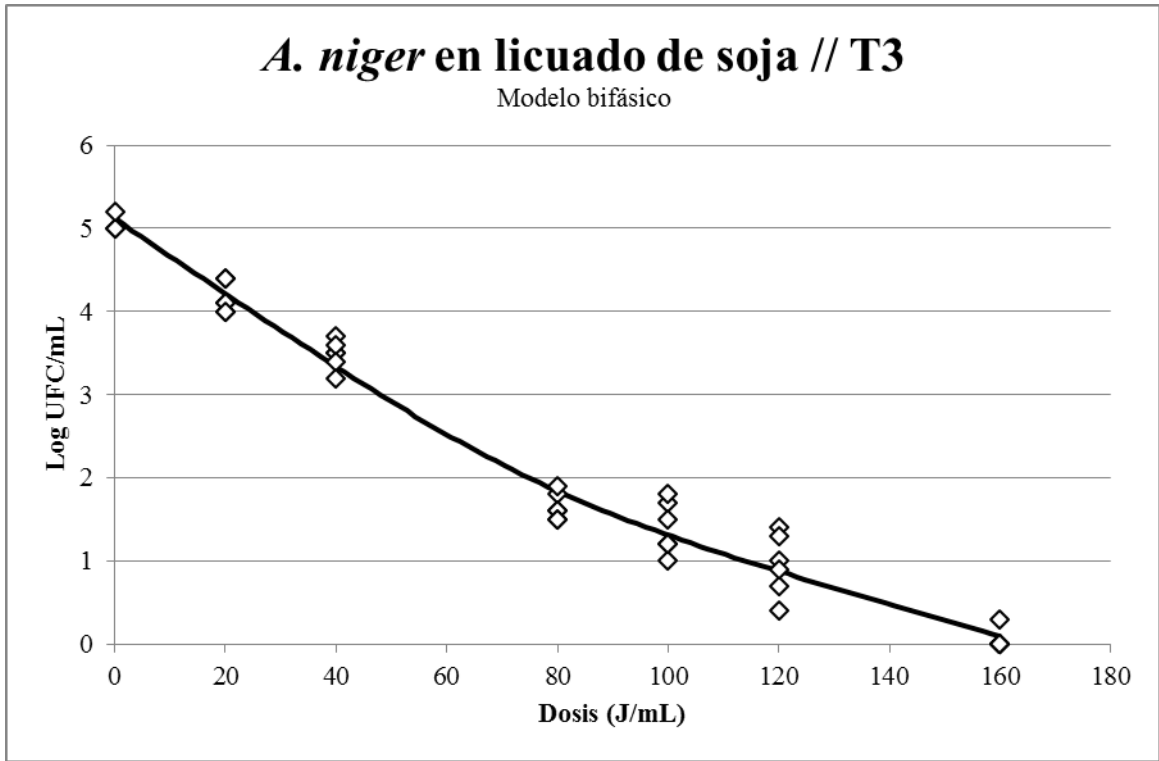
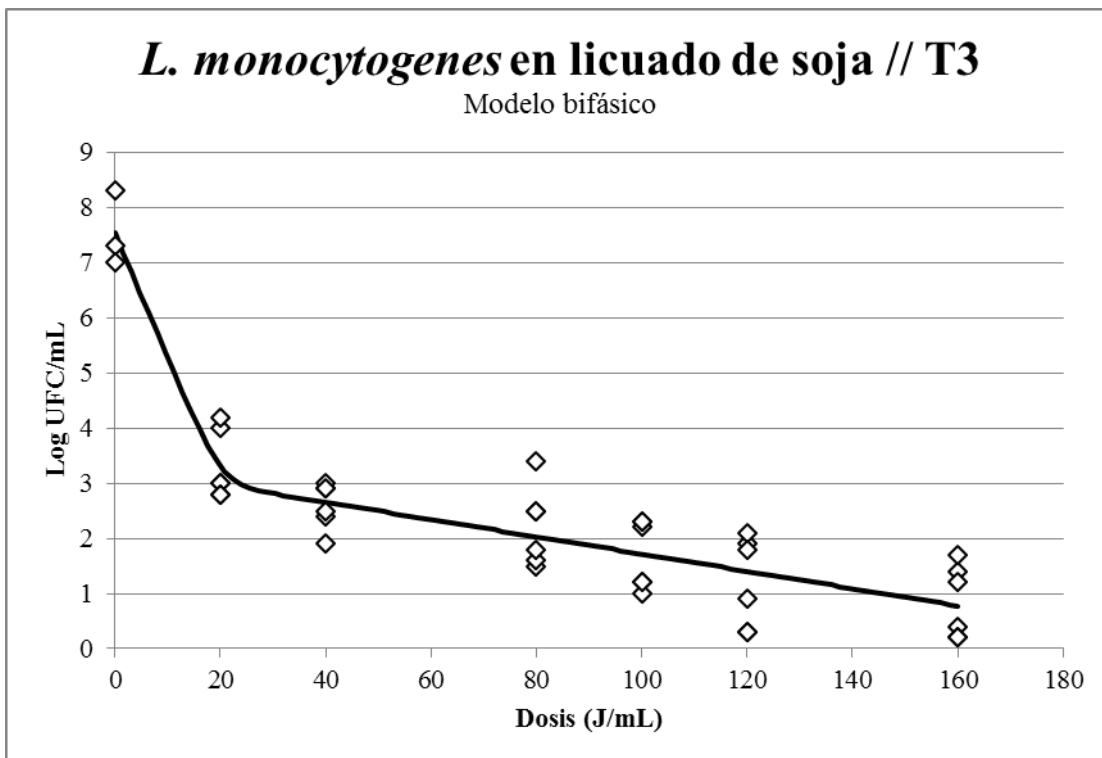
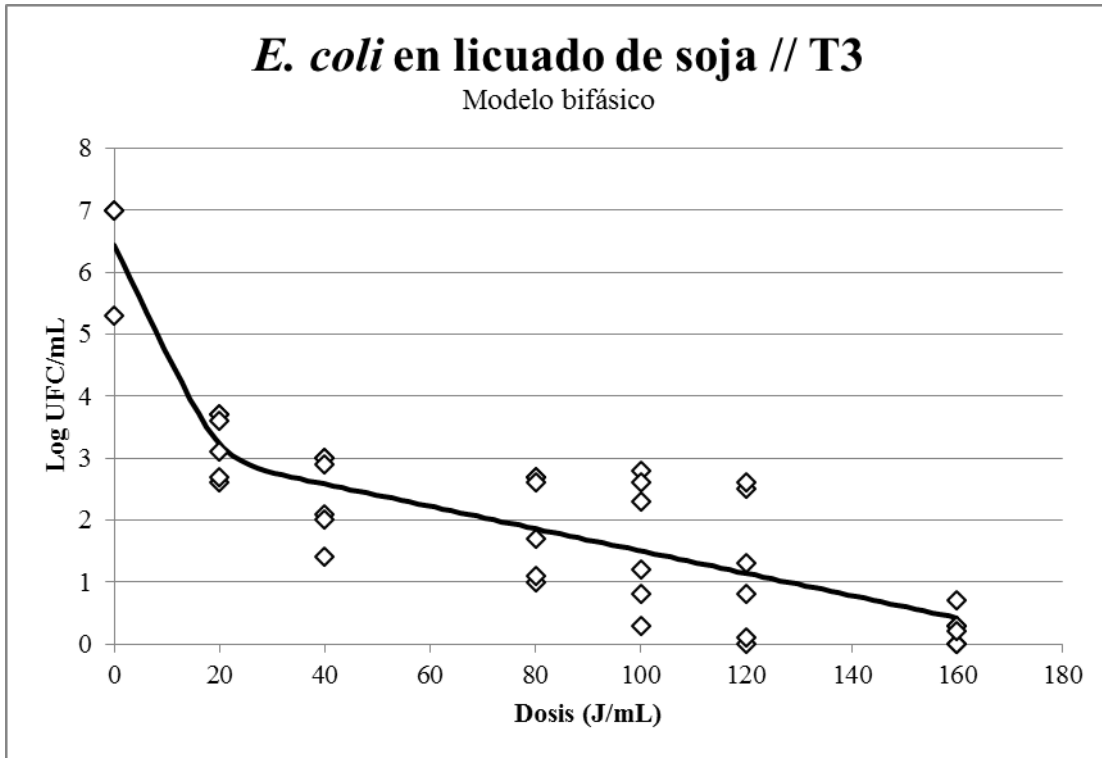
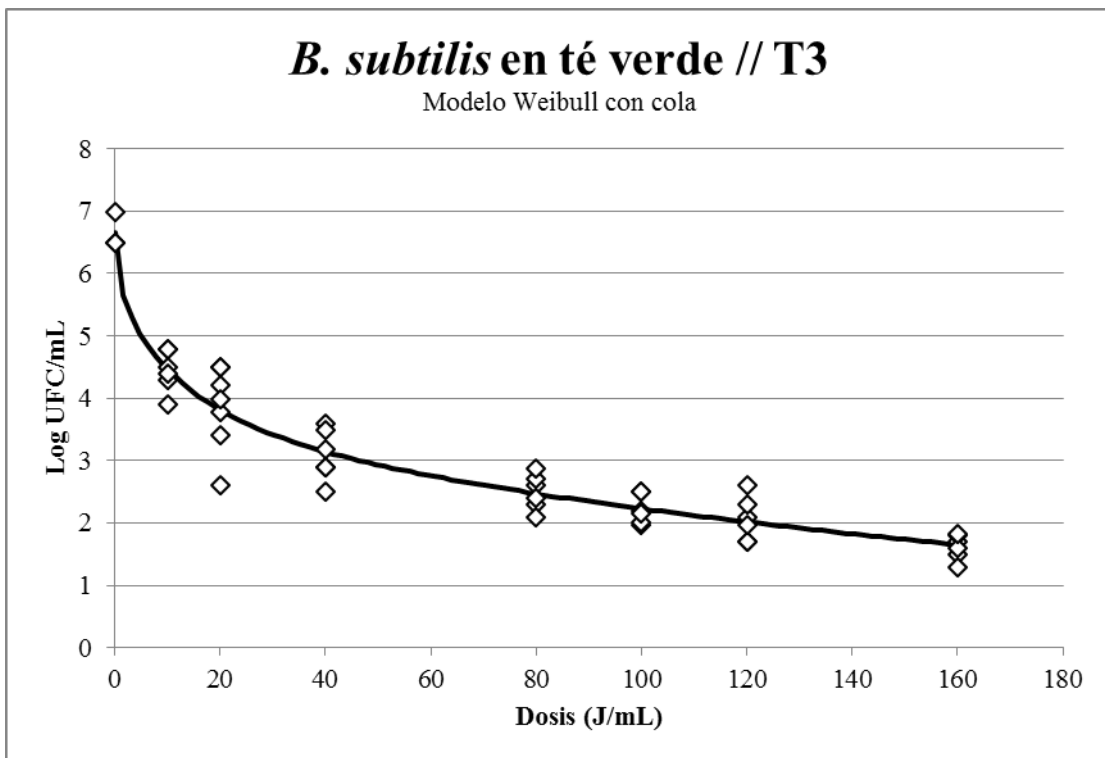
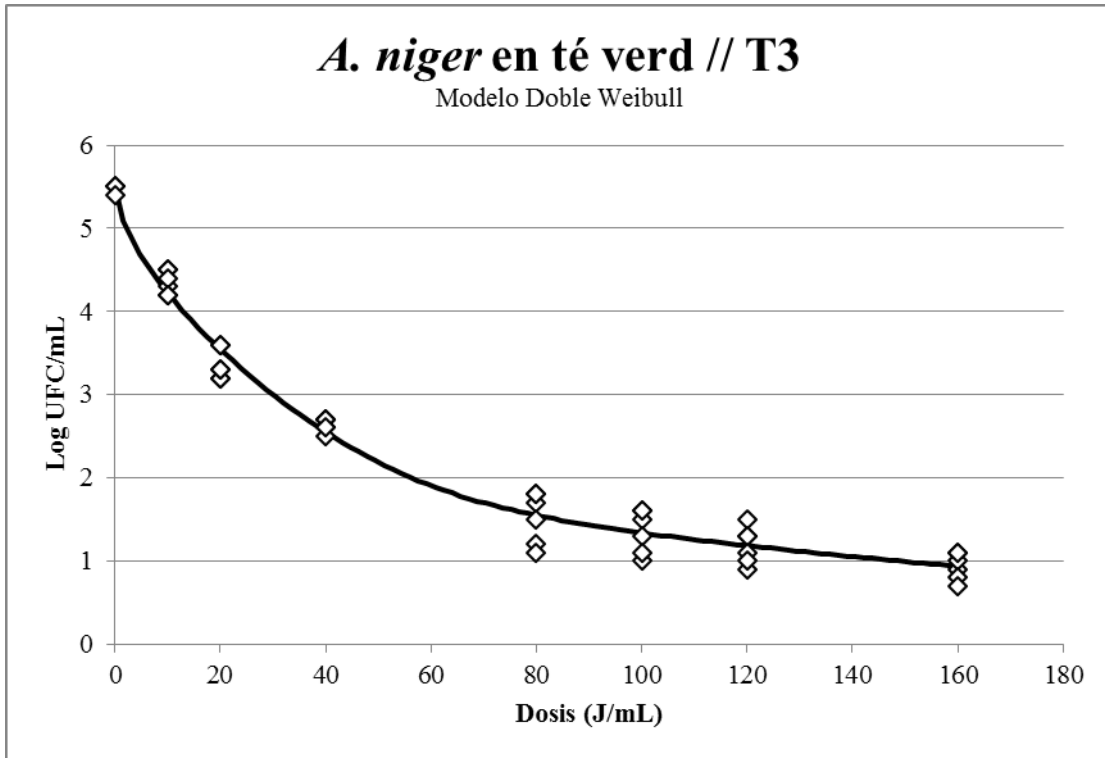


Figura 26: Valores de supervivencia observados (\diamond) de diferentes microorganismos después de la irradiación con UVC del tratamiento 2 (T2) con diferentes dosis en las matrices estudiadas. La línea negra representa la curva calculada según el modelo con el mejor ajuste en cada uno de los casos.









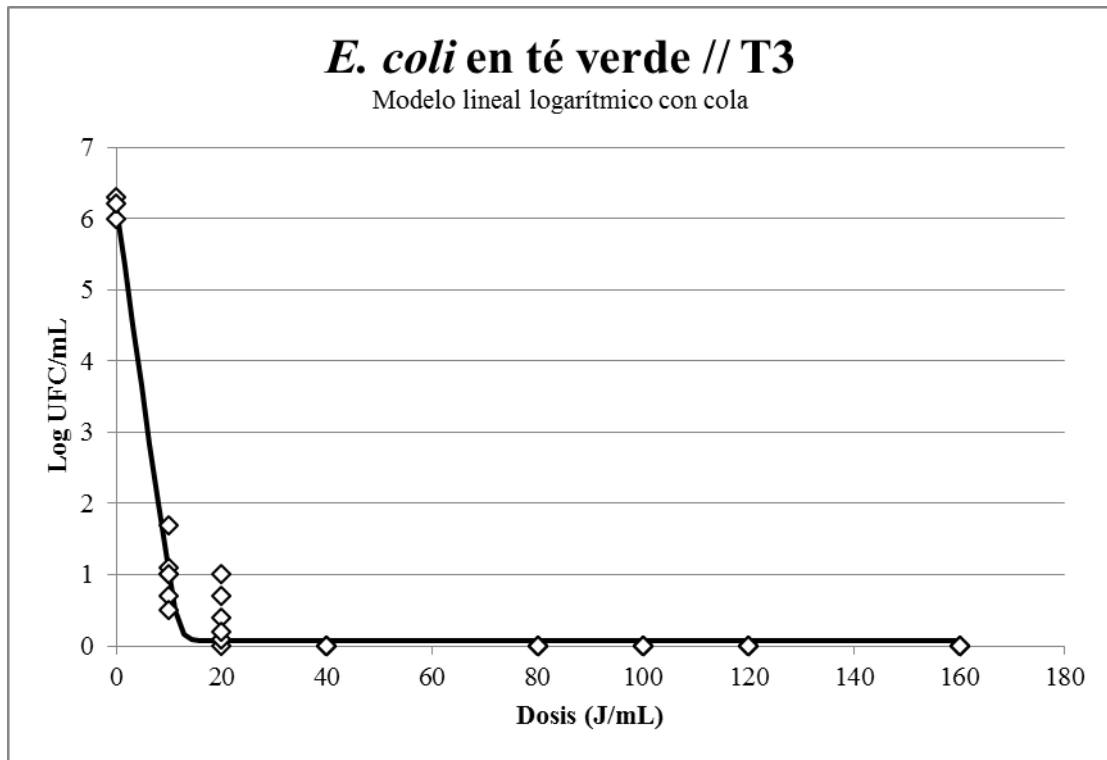


Figura 27: Valores de supervivencia observados (\diamond) de diferentes microorganismos después de la irradiación con UVC del tratamiento 3 (T3) con diferentes dosis en las matrices estudiadas. La línea negra representa la curva calculada según el modelo con el mejor ajuste en cada uno de los casos.

Tabla 21: Valores $4D_{uvc}$ según el tipo de tratamiento, microorganismo, matriz y modelo aplicado.

Tratamiento	Microorganismo	RMSE	R ²	4D (J/mL)	Modelo	Matriz
T1	<i>B. subtilis</i>	0,21	0,71	-	Bifásico	Leche desnatada
	<i>B. subtilis</i>	0,23	0,22	-	Bifásico	Leche entera
	<i>B. subtilis</i>	0,45	0,28	-	Lineal	Licuado de soja
	<i>A. niger</i>	0,15	0,57	-	Logarítmico lineal con cola	
	<i>E. coli</i>	0,63	0,17	-	Weibull	
	<i>L. monocytogenes</i>	0,68	0,01	-	Lineal	
	<i>B. subtilis</i>	0,54	0,86	±116,8	Bifásico	Té verde
	<i>A. niger</i>	0,22	0,97	-	Weibull con cola	
	<i>E. coli</i>	0,32	0,97	±46,4	Doble Weibull	
T2	<i>B. subtilis</i>	0,24	0,97	±94,4	Weibull con cola	Leche entera
	<i>B. subtilis</i>	0,45	0,91	±89,6	Weibull con cola	Leche desnatada
	<i>A. niger</i>	0,20	0,98	-	Doble Weibull	Licuado de soja
	<i>B. subtilis</i>	0,36	0,93	-	Weibull con cola	
	<i>E. coli</i>	0,97	0,59	±126,4	Doble Weibull	
	<i>L. monocytogenes</i>	0,51	0,88	±57,6	Bifásico	
	<i>A. niger</i>	0,23	0,97	±134,4	Bifásico	Té verde
	<i>B. subtilis</i>	0,51	0,75	±147,2	Doble Weibull	
<i>E. coli</i>	0,42	0,95	±33,6	Weibull con cola		
T3	<i>B. subtilis</i>	0,23	0,98	±43,2	Weibull con	Leche

					cola	desnatada
T3	<i>B. subtilis</i>	0,46	0,89	±91,2	Weibull con cola	Leche entera
	<i>A. niger</i>	0,25	0,98	±108,8	Bifásico	
	<i>B. subtilis</i>	0,35	0,96	±84,8	Weibull con cola	Licuada de soja
	<i>E. coli</i>	0,78	0,81	±49,6	Bifásico	
	<i>L. monocytogenes</i>	0,64	0,88	±19,2	Bifásico	
	<i>A. niger</i>	0,2110	0,98	±84,8	Doble Weibull	
	<i>B. subtilis</i>	0,3736	0,93	±67,2	Doble Weibull	Té verde
	<i>E. coli</i>	0,2404	0,98	±8	Logarítmico lineal con cola	

15. Efecto de los tratamientos UHPH y la aplicación combinada UHPH-UVC sobre esporas de *B. subtilis* en diferentes matrices

Para estudiar el posible efecto aditivo, sinérgico o complementario de la UVC juntamente con la UHPH se eligieron los microorganismos que presentaban mayor resistencia al tratamiento UVC (*B. subtilis* y *A. niger*) y en las matrices con un coeficiente de absorción elevado (licuado de soja, leche entera y desnatada) que limitaban la eficacia de los tratamientos UVC. Para llevar a cabo este estudio combinado de tecnologías se eligieron tratamientos de UHPH moderados (100 y/o 200 MP) a una temperatura de entrada de 20 y/o 60 °C y posteriormente de diferentes tratamientos UVC (T1, T2 y/o T3).

15.1. Resultados de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de *B. subtilis* en licuado de soja

En el licuado de soja inoculado con esporas de *B. subtilis* tratados mediante UHPH a diferentes presiones y temperaturas no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las diferentes condiciones aplicadas (**Figura 28**). El tratamiento más suave, consistente en una presión de 100 MPa a una temperatura de 20 °C, la reducción alcanzada fue de 0,62 log, pero utilizando el doble de presión (200 MPa) a la misma temperatura, la reducción solo aumentó 0,08 log. Con la misma presión de 200 MPa, pero aumentando la temperatura a 60 °C, la letalidad aumentó, hasta un promedio de 1,5 log de reducción, pero con una gran variabilidad, por lo que no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) con los otros tratamientos de UHPH.

Al realizar la combinación de las tecnologías de UHPH y UVC, la matriz fue inicialmente tratada mediante UHPH, y seguidamente se sometió a la acción de la radiación UVC con las características especificadas del tratamiento T2, a diferentes dosis de radiación (20 a 160 J/mL). La letalidad obtenida en los tratamientos combinados fue similar ($p \geq 0,05$) a la obtenida de forma individual cuando solo se aplicó radiación UVC (**Figura 28**).

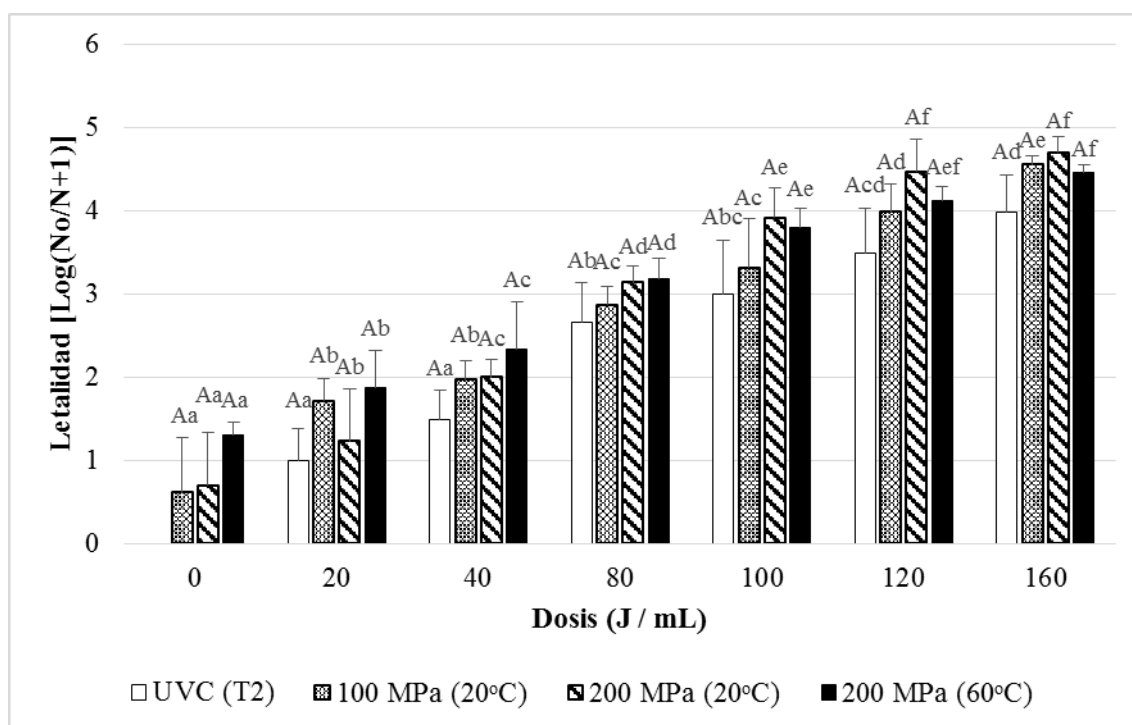


Figura 28: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en licuado de soja causados por la combinación de los tratamientos UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con el tratamiento (T2). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) un mismo tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre un mismo tratamiento UHPH pero igual dosis de UVC.

15.2. Resultados de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de *B. subtilis* en leche desnatada

Considerando los resultados obtenidos en el licuado de soja, cuando al realizar los tratamientos de la leche entera y desnatada se eligió la condición de tratamiento por UHPH más efectiva, en este caso, 200 MPa a 60 °C. De igual forma, al no obtener resultados satisfactorios con la combinación de UHPH con los tratamientos UVC T2 en licuado de soja, se investigó el efecto de los tratamientos UVC más suaves (T1) y más intensos (T3). Como se observa en la **Figura 29**, la eficacia del tratamiento UHPH en la letalidad de *B. subtilis* en la leche desnatada fue muy reducido y al combinar ambos tratamientos, y al contrario de los observado en el licuado de soja, se observó que las letalidades fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que cuando se aplicaron de

forma individual los tratamientos de radiación UVC, independientemente del tipo de tratamiento que se aplicara (T1 y T3). Sin embargo, la evolución en la letalidad en función de la dosis UVC fue similar, es decir un aumento de la letalidad al incrementar la dosis aplicada (**Figura 29**).

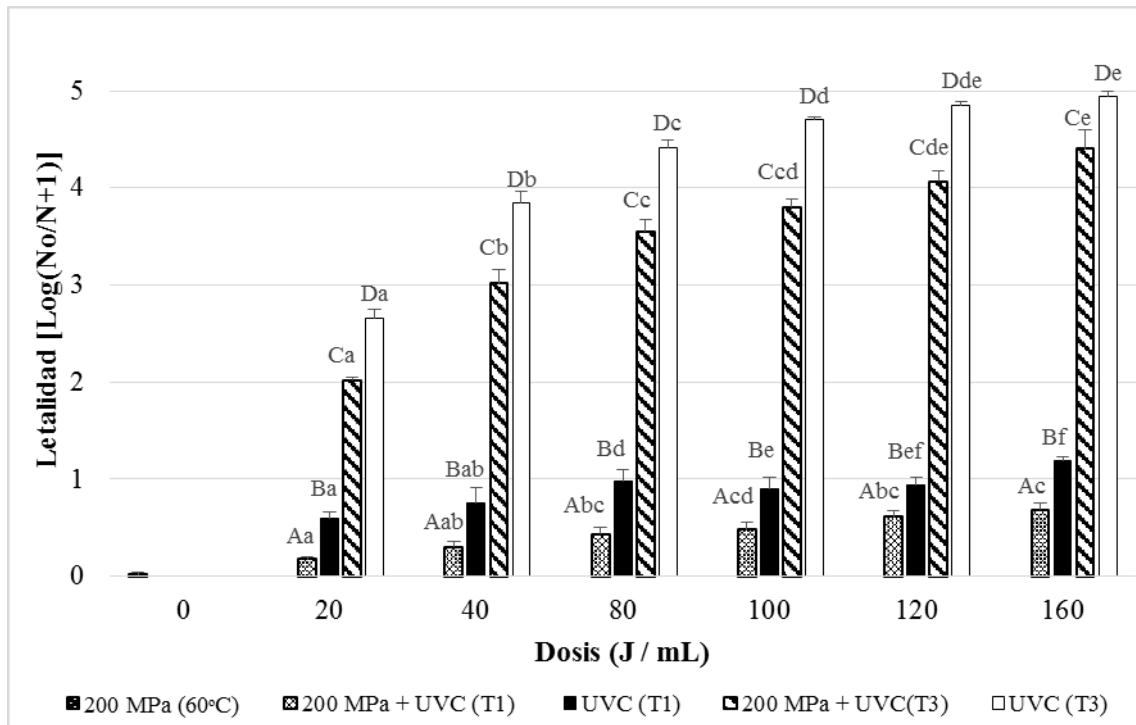


Figura 29: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche desnatada causados por la combinación del tratamiento UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con diferentes número de pases (T1 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH con los diferentes tratamientos UVC (T1 y T3) pero a igual dosis de UVC.

15.3. Resultados de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de *B. subtilis* en leche entera

En el caso de la leche entera, al igual que en las otras dos matrices, la letalidad en las esporas de *B. subtilis* tras el tratamiento UHPH de 200 MPa a 60 °C fue inferior a un logaritmo, aunque superior a la determinada en leche desnatada. Además, al aplicar la combinación de ambos tratamientos, se determinó que en el caso de los tratamientos

UHPH-UVC T1 la letalidad obtenida fue de aproximadamente un logaritmo más ($p < 0,05$) que cuando se trató de forma individual con UVC. Por el contrario, al combinar el tratamiento UHPH con los tratamientos T3 de UVC a las dosis más suaves (20 y 40 J/mL) la letalidad obtenida fue mayor cuando se aplicó únicamente el tratamiento UVC, mientras que a dosis más elevadas (80-160 J/mL) no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) (Figura 30).

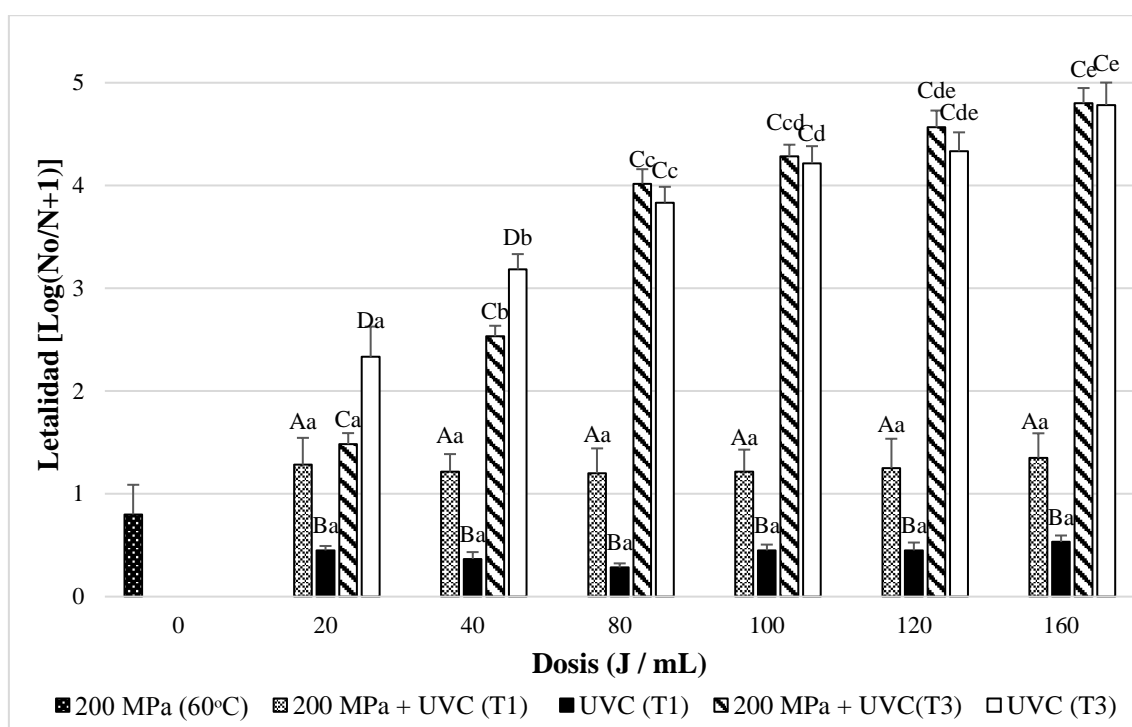


Figura 30: Niveles de reducción de los recuentos de esporas de *B. subtilis* inoculadas en leche entera causados por la combinación del tratamiento UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con diferentes número de pases (T1 y T3). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento UHPH con los diferentes tratamientos UVC (T1 y T3) pero a igual dosis de UVC.

16. Discusión sobre el efecto de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre esporas de *B. subtilis*

Al tratar esporas de *B. subtilis* con UHPH (100-200 MPa a 20 y 60 °C) no se obtuvo una reducción microbiana significativa en ninguna de las matrices (licuado de soja, leche entera y leche desnatada) en ninguna de las condiciones de presión y temperatura ensayadas. La alta resistencia de las esporas bacterianas a los tratamientos UHPH en matrices como la leche y el licuado de soja ya fue descrita por diversos autores (Pinho et al. 2011; Poliseli-Scopel et al. 2012; Amador Espejo et al. 2014). En estos trabajos se describe que la temperatura a la que se realiza el tratamiento UHPH influye enormemente en el grado de inactivación de esporas bacterianas alcanzado. Amador Espejo et al. (2014) estudió la letalidad en esporas de *Bacillus* spp. inoculadas en leche entera tratada por UHPH a temperaturas de entre 55 y 85 °C, observando que las esporas de *B. sporothermodurans*, *B. cereus*, *B. liqueniformes* y *B. coagulans* presentaron una mayor sensibilidad a los tratamientos por UHPH que las esporas de *B. subtilis* y *G. stearothermophilus*, y que en las dos últimas fue necesario utilizar temperaturas de 85 °C para poder alcanzar una reducción de 5 log. A 55 °C la letalidad fue en general reducida (entre 0,5 y 3 log, según la especie). De igual manera, Poliseli-Scopel et al. (2012), también determinaron que para la reducción de 5 log de esporas de *B. cereus* aplicando tratamientos de UHPH de 300 MPa a 80 °C.

De esta manera, parece necesario que la tecnología de UHPH, deba combinarse con otra tecnología o condición desfavorable para poder alcanzar reducciones significativas de esporas bacterianas en un alimento. La combinación de tecnologías permite, además, trabajar con unas condiciones más suaves, lo que resulta beneficioso, tanto para el alimento como para el equipo. Además, presiones de 300 MPa están al límite de las prestaciones de un equipo de UHPH, lo cual puede provocar un desgaste superior que si se trabajara con presiones más suaves de 100 MPa o 200 MPa.

No obstante, en este estudio no se observó un efecto sinérgico ni aditivo al someter la leche entera, la leche desnatada y el licuado de soja inoculados con esporas de *B. subtilis* a tratamientos combinados de UHPH y UVC, a excepción de la leche entera a tratamientos de UVC suaves (T1), aunque la letalidad obtenida fue de alrededor de 2 log. Mientras que cuando se estudió el efecto con la leche desnatada y leche entera, las letalidades obtenidas tras aplicar el tratamiento UHPH y combinarlo con radiación UVC disminuyeron respecto a los tratamientos UVC. La posible explicación puede

relacionarse con cambios en las propiedades físicoquímicas que la UHPH produce en la matriz (**Tabla 22**), en los que la absorbancia a 254 nm y la turbidez, después de los tratamientos por UHPH aumenta considerablemente en todos los casos y comprometiendo la efectividad de los tratamientos UVC. Además, diversos estudios han reportado un aumento en el número de partículas en suspensión por la disminución de su tamaño (Pereda et al. 2007; Amador Espejo et al. 2014) lo que podría provocar la difracción de la luz UVC que evitaría que la luz ultravioleta incidiera sobre los microorganismos reduciendo la efectividad del tratamiento por UVC (Gross et al. 2015; Kaya y Unluturk, 2015). El efecto matriz tiene una gran relevancia en este caso, ya que en un estudio previo (Reverter-Carrión et al. 2018), donde se utilizó una solución tamponada (PBS), sin partículas en suspensión, para valorar el comportamiento de las esporas de *B. subtilis*, sí que se observó un efecto de tipo aditivo, en el aumento de la letalidad al combinar al combinar tratamientos de UHPH y UVC.

Tabla 22: Efecto de los tratamientos de UHPH sobre las características físicoquímicas de las matrices

	Leche desnatada		Licuado de soja		Leche entera	
	Antes UHPH	Después UHPH	Antes UHPH	Después UHPH	Antes UHPH	Después UHPH
Absorbancia (254 nm) (cm⁻¹)	264 ± 0,03	412 ± 0,02	500 ± 0,04	678 ± 0,03	801 ± 0,02	1012 ± 0,02
Turbidez (NTU)	18.416 ± 0,04	21.630 ± 0,03	35.983 ± 0,04	39.457 ± 0,03	77.967 ± 0,01	102.458 ± 0,01
pH	6,68 ± 0,02	6,67 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,37 ± 0,02	6,67± 0,01	6,68± 0,01
Viscosidad (Pa·s)	1,707 ± 0,01	1,914 ± 0,01	4,047 ± 0,03	4,051 ± 0,01	2,082 ± 0,01	2,049 ± 0,02
Densidad (g/mL)	1,037 ± 0,000	1,034 ± 0,000	1,014 ± 0,000	1,015 ± 0,000	1,033 ± 0,000	1,027 ± 0,000

NTU: Unidades nefelométrica de turbidez

17. Efecto de los tratamientos UHPH, UVC y UHPH-UVC sobre conidiosporas de *A. niger* en licuado de soja

Al tratar por UHPH el licuado de soja inoculado con conidiosporas de *A. niger* a una presión de 100 MPa a 20 °C se observó que la reducción logarítmica causada fue muy

leve (0,12 log). No obstante, al aumentar la presión a 200 MPa, se consiguió una letalidad completa (por debajo del límite de detección), con independencia de la temperatura del tratamiento utilizado (20 o 60 °C) (**Figura 31**), por lo que al aplicar los tratamientos de UVC, en este caso el tratamiento T2 a diferentes dosis no se pudo determinar cuál fue el efecto asociado a la combinación. Sin embargo, en el caso de las muestras tratadas a 100 MPa en combinación con la UVC, se observó que con el tratamiento individual UVC la letalidad fue significativamente superior ($p < 0,05$) que con el tratamiento combinado, de forma que aplicando solo radiación UVC se conseguieron 2 log de reducción más tratando de forma combinada UHPH-UVC (**Figura 31**).

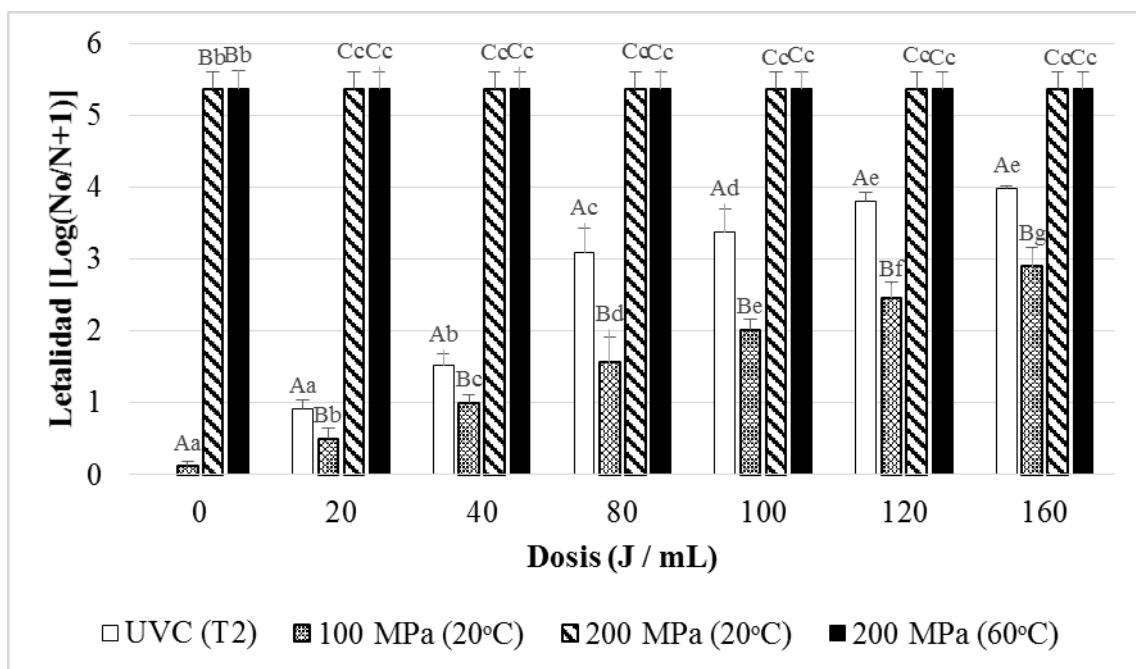


Figura 31: Niveles de reducción de los recuentos de conidiosporas de *A. niger* inoculadas en licuado de soja causados por la combinación de los tratamientos UHPH y UVC junto a tratamientos simples de UVC a diferentes dosis (J/mL) con el tratamiento (T2). Los resultados se expresan como el logaritmo de los recuentos iniciales menos los finales expresados en UFC/mL \pm DS. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) un mismo tratamiento UHPH pero diferente dosis de UVC. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre un mismo tratamiento UHPH pero igual dosis de UVC.

18. Discusión sobre el efecto de los tratamientos UHPH y UHPH-UVC sobre las conidiosporas de *A. niger*

Al tratar licuado de soja inoculado con conidiosporas de *A. niger* por UHPH, se logró una inactivación total de este microorganismo a una presión de 200 MPa, tanto a 20 °C como a 60 °C. Si bien se logró la misma reducción logarítmica con una presión menor (200 MPa) que la que fue necesaria (300 Pa) por Reverter-Carrión et al. (2018) en solución fosfato con caramelo, no se pudo evaluar un posible efecto sinérgico entre la temperatura y la presión como sí fue observado por dichos autores.

Al disminuir la presión a 100 MPa a 20 °C, no se observaron diferencias significativas respecto a la muestra no tratada (control). Con estas condiciones se evaluó el efecto de la combinación con un tratamiento de UVC. Como se ha mencionado anteriormente, al combinar los tratamientos de UHPH a esta presión con UVC en licuado de soja inoculado con conidiosporas de *A. niger*, la letalidad disminuyó considerablemente. Esta disminución en la letalidad, puede ser debido al mismo fenómeno observado en la leche con *B. subtilis*. El tratamiento por UHPH en licuado de soja también aumenta el número de partículas en suspensión debido a la disminución de su tamaño (Poliseli-Scopel et al., 2012) produciendo así una dispersión de la luz UVC, evitando que la luz ultravioleta llegue a los microorganismos reduciendo la efectividad del tratamiento por UVC (Gross et al. 2015; Kaya y Unluturk, 2015). Cabe destacar que no en todas las esporas fúngicas ocurre el mismo efecto ya que, en un estudio realizado con ascosporas fúngicas de *Talaromyces macrosporus* y *Neosartorya spinosa* inoculadas en zumo de manzana clarificado (Sauceda-Gálvez et al. 2019), observaron que la combinación de ambos tratamientos produjo un aumento de la letalidad. Esto fue debido a que la UHPH aumentó la susceptibilidad de estas esporas a la radiación UVC, ya que se produjo un cambio estructural en las esporas fúngicas, dejando expuesto el material genético a la radiación UVC. Además, el efecto de las partículas en suspensión fue mínimo al tratarse de un zumo clarificado.

Si bien el efecto en la letalidad microbiana de los equipos UHPH depende en gran medida del diseño de la válvula (características geométricas de la aguja y el asiento) y por lo tanto pueden influir mucho en los resultados obtenidos (Dumay et al. 2013; Reverter-Carrión et al. 2018), para la comparación de todos los resultados obtenidos con otros autores se eligieron aquellos que el equipo UHPH tuviera la mismas características que el de la presente tesis.

VI. CONCLUSIONES

1. La eficacia de los tratamientos UVC en el reactor utilizado, en régimen de flujo laminar, depende principalmente de las propiedades intrínsecas de las matrices. Así, en matrices con elevado coeficiente de absorción, como el licuado de soja y la leche, el factor de mayor relevancia es el número de entradas en el reactor o valor NET, mientras que en los de baja absorción, como el té verde, el factor más condicionante es la dosis de radiación UVC aplicada.
2. La sensibilidad de los microorganismos a los tratamientos UVC varía en función del valor NET y la dosis de radiación UVC aplicada. De forma general, tanto en matrices con alto coeficiente de absorción, como el licuado de soja, como de bajo coeficiente, como el té verde, la resistencia observada fue, en orden decreciente: conidiosporas de *Aspergillus niger*, esporas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.
3. Los modelos de inactivación de los tratamientos UVC para *B. subtilis* mostraron un mejor ajuste con modelos no lineales, como Weibull (con cola), en matrices con un alto coeficiente de absorción (leche y licuado de soja). En el caso de *A. niger*, el mejor ajuste fue con el modelo bifásico, o doble Weibull.
4. El efecto combinado de los tratamientos de UHPH a 100 y 200 MPa, con temperaturas de entrada de 20 o 60 °C, combinados con tratamientos UVC, aplicados sobre esporas de *B. subtilis* inoculadas en matrices de alto coeficiente de absorción, no mostró ningún efecto sinérgico o aditivo, siendo la letalidad obtenida similar a la de los tratamientos de UVC en el caso del licuado de soja y leche entera, e inferior en el caso de la leche desnatada.
5. El efecto de los tratamientos UHPH a 200 MPa y 60 °C en licuado de soja inoculado con conidiosporas de *A. niger*, se mostró mucho más eficiente que los

tratamientos UVC, logrando una letalidad absoluta. La aplicación conjunta de tratamientos UHPH y UVC presentaría, por tanto, un efecto complementario al lograr reducir una gama más amplia de microorganismos.

6. En las matrices con elevado coeficiente de absorción es difícil conseguir una esterilización comercial por tratamientos UVC, ya que la dosis de radiación UVC necesarias estimadas en los modelos fueron muy elevadas, aunque sí que sería factible su uso en matrices de bajo coeficiente, el té verde, especialmente si se combinara con UHPH.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. UNE-EN-13704. (2002). Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad esporicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades.
- AENOR. UNE-EN-1650. (2008). Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área alimentaria, industrial, doméstica e institucional. Agencia Española Normalización y Certificación.
- Albert, I., y Mafart, P. (2005). A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1–3), 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.016>
- Altic, L. C., Rowe, M. T., y Grant, I. R. (2007). UV light inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk as assessed by FASTPlaqueTB phage assay and culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3728–3733. <https://doi.org/10.1128/AEM.00057-07>
- Amador Espejo, G. G., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., y Trujillo, A. J. (2014). Inactivation of *Bacillus* spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. *Food Microbiology*, 44, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.010>
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.012>
- Atomssa, T., y Gholap, A. V. (2015). Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer. *Journal of Engineering and Technology Research*, 7(1), 22–31. <https://doi.org/10.5897/JETR2014.0527>
- Bandla, S., Choudhary, R., Watson, D. G., y Haddock, J. (2012a). UV-C treatment of soymilk in coiled tube UV reactors for inactivation of *Escherichia coli* W1485 and *Bacillus cereus* endospores. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.024>
- Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S. S., Lohan, S., Bhardwaj, V., ... Jyoti, S. (2013). Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International*, 53(2), 568–584. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.032>
- Bearth, A., y Siegrist, M. (2019). “As long as it is not irradiated” – Influencing factors of US consumers’ acceptance of food irradiation. *Food Quality and Preference*, 71, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.06.015>

- Begum, M., Hocking, A. D., y Miskelly, D. (2009). Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.020>
- Bigelow, J. . R. E. (1920). The Thermal Death Point in Relation to Time of Typical Thermophilic Organisms. *The Source Diseases Infectious*, 27(6), 602–617.
- Bolton, J. R., y Linden, K. G. (2003). Standardization of methods for fluence (UV Dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering*, 129(3), 209–215. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)0733-9372\(2003\)129:3\(209\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0733-9372(2003)129:3(209))
- Bornhorst, E. R., Liu, F., Tang, J., Sablani, S. S., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2017). Food quality evaluation using model foods: a comparison study between microwave-assisted and conventional thermal pasteurization processes. *Food and Bioprocess Technology*, 10(7), 1248–1256. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1900-9>
- Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., y Keener, K. (2018). The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. *Trends in Biotechnology*, 36(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>
- Buchanan, R.L., Golden, M.H. and Whiting, R.C. (1993) Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic-acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J Food Prot* 56, 474–478.
- Burton, H. 1951. Ultra-violet irradiation of milk. *Dairy Sci. Abstr.* 13(3):229-244.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J., y Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiology*, 17(6), 633–641. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0359>
- Capstick, E., H.A. Hall, and F.K. Neave. (1946). Further Developments in Dairying in Germany. Final Report No. 770. British Intelligence Objectives Sub-Committee Trip No. 2144.
- CECT, Colección Española de Cultivos Tipo. Recuperación de cultivos liofilizados de la CECT. Visitado en abril 2016. <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/coleccion-espanola-cultivos-tipo/recuperacion-cultivos-liofilizados-cept-1285872233521/Recurs.html?id=1286053041583>
- Cerf, O. (1977). Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00665.x>
- Chang, J. C. H., Ossoff, S. F., Lobe, D. C., Dorfman, M. H., Dumais, C. M., Qualls, R. G., y Johnson, J. D. (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1361–1365.

- Char, C. D., Mitiliniaki, E., Guerrero, S. N., y 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. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0307-7>
- Charoux, C. M. G., O'Donnell, C. P., y Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound Processing and Food Quality. In D. Bermudez-Aguirre (Ed.), *Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation* (1st ed., Vol. 1, pp. 215–235).
- Chaves-López, C., Lanciotti, R., Serio, A., Paparella, A., Guerzoni, E., y Suzzi, G. (2009). Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. *Food Control*, 20(8), 691–695. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.001>
- Chevrefils, G., Caron, É., Wright, H., y Sakamoto, G. (2006). UV dose required to achieve incremental log inactivation of bacteria, protozoa and viruses. *IUVA News*, 8(1), 38–45.
http://uvsalesinfo.com/Documents/NavLink/UV_Destruction_Chart_uid7102009502412.pdf
- Choudhary, R., Bandla, S., Watson, D. G., Haddock, J., Abughazaleh, A., y Bhattacharya, B. (2011). Performance of coiled tube ultraviolet reactors to inactivate *Escherichia coli* W1485 and *Bacillus cereus* endospores in raw cow milk and commercially processed skimmed cow milk. *Journal of Food Engineering*, 107(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.009>
- Codina Torrella, I. (2014). Optimización del proceso de elaboración y aplicación de la homogenización a ultra alta presión como tecnología de conservación de licuado de chufa. TDX (Tesis Doctorals En Xarxa). <http://www.tdx.cat/handle/10803/284870>
- Colejo, S., Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., González-Raurich, M., y López, M. (2018). Evaluation of ultraviolet light (UV), non-thermal atmospheric plasma (NTAP) and their combination for the control of foodborne pathogens in smoked salmon and their effect on quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.002>
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., y Mafart, P. (2006). General model, based on two mixed weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6493–6502. <https://doi.org/10.1128/AEM.00876-06>
- Corrales, M., de Souza, P. M., Stahl, M. R., y Fernández, A. (2012). Effects of the decontamination of a fresh tiger nuts' milk beverage (horchata) with short wave ultraviolet treatments (UV-C) on quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 163–168. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053354213&partnerID=40&ynd5=d56eed62307c5f09862160be3b3c1c01>

- Crook, J. A., Rossitto, P. V., Parko, J., Koutchma, T., y Cullor, J. S. (2015). Efficacy of ultraviolet (uv-c) light in a thin-film turbulent flow for the reduction of milkborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6), 506–513. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1843>
- Cruz Cansino, N. (2009). Efecto de la ultra alta presión de homogeneización en licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado. Universitat Autònoma de Barcelona. <https://ddd.uab.cat/record/37959>
- Dasan, B. G., Boyaci, I. H., y Mutlu, M. (2016). Inactivation of aflatoxigenic fungi (*Aspergillus* spp.) on granular food model, maize, in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system. *Food Control*, 70, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.015>
- Donaghy, J., Keyser, M., Johnston, J., Cilliers, F. P., Gouws, P. A., y Rowe, M. T. (2009). Inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in milk by UV treatment. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2), 217–221. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02644.x>
- Du, W., Zhou, M., Liu, Z., Chen, Y., y Li, R. (2018). Inhibition effects of low concentrations of epigallocatechin gallate on the biofilm formation and hemolytic activity of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 85, 119–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.011>
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., y Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science and Technology*, 31(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>
- EFSA. (2016). Safety of UV-treated milk as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal* (Vol. 14). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4370>
- Ehlermann, D. A. E. (2016). Wholesomeness of irradiated food. *Radiation Physics and Chemistry*, 129, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.08.014>
- Elbrhami, A. (2016). A comparative study of the effects of high hydrostatic pressure and ultraviolet light on stability, health related constituents and quality parameters of tiger nut milk. Tesis de The University of Guelph, Canada. <http://hdl.handle.net/10214/10121>
- Engin, B., y Karagul Yuceer, Y. (2012). Effects of ultraviolet light and ultrasound on microbial quality and aroma-active components of milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1245–1252. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4689>
- Eselin, J., Mallea, S., Ram, A. F. J., y Carlin, F. (2013). Role of pigmentation in protecting *aspergillus niger* conidiospores against pulsed light radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 89(3), 758–761. <https://doi.org/10.1111/php.12037>

- Fernández Avila, C. (2016). Stability assessment of emulsions treated by ultra-high pressure homogenization and their incorporation in a uht milk-based product for delivery of conjugated linoleic acid. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Autònoma de Barcelona. <http://www.tdx.cat/handle/10803/399169>
- Fundación Daniel y Nina Carasso (2019) La Alimentación Sostenible en España. (2017). Visitado en marzo, 2019, de la <https://www.fondationcarasso.org/es>.
- Gachovska, T. K., Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., y Williams, F. (2008). Ultraviolet and pulsed electric field treatments have additive effect on inactivation of *E. coli* in apple juice. *Journal of Food Science*, 73(9), 412–417. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00956.x>
- Galanakis, C., 2015. Food Waste Recovery-Processing Technologies and Industrial Techniques. Academic Press, San Diego, CA.
- García Carrillo, M., Ferrario, M., y Guerrero, S. (2017). Study of the inactivation of some microorganisms in turbid carrot-orange juice blend processed by ultraviolet light assisted by mild heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 212, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.005>
- Gaulin A. (1899) System for Intimately Mixing Milk. USA Patent Application 125440.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., y Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185–209. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00362-7)
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., y Van Impe, J. F. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.11.038>
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V., y Guamis, B. (1997a). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 60(1), 33–37. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-60.1.33>
- Gervilla, R., Felipe, X., Ferragut, V., y Guamis, B. (1997b). Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2297–2303. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(97\)76179-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(97)76179-4)
- Gervilla, R., Sendra, E., Ferragut, V., y Guamis, B. (1999). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* in ovine milk subjected to high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1099–1107. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75332-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75332-4)

- Gopal, J., Muthu, M., Paul, D., Kim, D. H., y Chun, S. (2016). Bactericidal activity of green tea extracts: The importance of catechin containing nano particles. *Scientific Reports*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19710>
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334–350. [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(92\)90041-F](https://doi.org/10.1016/0091-7435(92)90041-F)
- Gross, A., Stangl, F., Hoenes, K., Sift, M., y Hessling, M. (2015). Improved drinking water disinfection with UVC-LEDs for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* utilizing quartz tubes as light guide. *Water (Switzerland)*, 7(9), 4605–4621. <https://doi.org/10.3390/w7094605>
- Hayes, M. G., Fox, P. F., y Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25–33. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000524>
- Hoyer, O. (2000). The status of UV technology in Europe irradiance. *IUVA News* 2:22-27
- John, D., y Ramaswamy, H. S. (2018). Pulsed light technology to enhance food safety and quality: a mini-review. *Current Opinion in Food Science*, 23, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.06.004>
- Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., y Geiser, D. (2003). Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 883–888.
- Kaya, Z., y Unluturk, S. (2015). Processing of clear and turbid grape juice by a continuous flow UV system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.006>
- Keener, K. M., y Misra, N. N. (2016). Future of Cold Plasma in Food Processing. In *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications* (pp. 343–360). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00014-7>
- Keener, L., y Krishnamurthy, K. (2014). Shedding Light on Food Safety: Applications of Pulsed Light Processing. Retrieved from <https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/junejuly-2014/shedding-light-on-food-safety-applications-of-pulsed-light-processing/>
- Knirsch, M. C., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira Soares Vicente, A. A., y Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(9), 436–441. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.003>
- Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., y Parisi, B. (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.004>

- Koutchma, T. (2014). Preservation and Shelf Life Extension: UV Applications for Fluid Foods. Preservation and Shelf Life Extension: UV Applications for Fluid Foods. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00049-7>
- Koutchma, T. (2016). Ultraviolet light for decontamination and preservation of beverages, liquid foods, and ingredients. In Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21200-6>
- Koutchma, T. (2017). Pulsed Light for Food and Beverages Preservation, Quality and Functionality. Reference Module in Food Science, 1, 1–8. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22454-2>
- Koutchma, T., Forney, L. J., y Moraru, C. I. (2009). Ultraviolet light in food technology: Principles and applications. Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications. CRC Press.
- Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., y Parisi, B. (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 5(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.004>
- Koutchma, T., Popović, V., Ros-Polski, V., y Popielarz, A. (2016). Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(5), 844–867. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12214>
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., y Irudayaraj, J. M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. Journal of Food Science, 72(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00438.x>
- Krishnamurthy, Kathiravan, Khurana, H. K., Soojin, J., Irudayaraj, J., y Demirci, A. (2008). in Food Processing : An Overview. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, 7(1), 2–13. Retrieved from <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119423781/abstract>
- Krishnamurthy, Kathiravan, Tewari, J. C., Irudayaraj, J., y Demirci, A. (2010). Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and infrared heating. Food and Bioprocess Technology, 3(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0084-8>
- Kuo, J., Chen, C., y Nellor, M. (2003). Standardized Collimated Beam Testing Protocol for Water/Wastewater Ultraviolet Disinfection. Journal of Environmental Engineering, 129(8), 774–779. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)0733-9372\(2003\)129:8\(774\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0733-9372(2003)129:8(774))
- Lembke, A. 1949. “Milchentkeimung ohne Warmeanwedung?” Volkswirtschaftlicher

- Lu, G., Li, C., y Liu, P. (2011). UV inactivation of milk-related microorganisms with a novel electrodeless lamp apparatus. *European Food Research and Technology*, 233(1), 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1498-5>
- Luechapattanaporn, K., Wang, Y., Wang, J., Tang, J., y Al, E. (2005). Food engineering and physical properties sterilization of scrambled eggs in military. *Journal of Food Science*, 70(4), E288–E294. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/194389739?accountid=15533>
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., y Leguerinel, I. (2001). On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *Acta Horticulturae*, 566, 107–114. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.566.11>
- Maktabi, S., Watson, I., y Parton, R. (2011). Synergistic effect of UV, laser and microwave radiation or conventional heating on *E. coli* and on some spoilage and pathogenic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(2), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.011>
- Matak, K., y Churey, J. (2005). Efficacy of UV light for the reduction of *Listeria monocytogenes* in goat's milk. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2212–2216. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2212>
- Matak, Kristen E. (2004). Effects of UV Irradiation on the Reduction of Bacterial Pathogens and Chemical Indicators of Milk. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Mbata, T. I. (2008). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*, 7(10), 1571–1573.
- McKay, A. M. (2016). Inactivation of fungal spores in apple juice by high pressure homogenization. *Journal of Food Protection*, 72(12), 2561–2564. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.12.2561>
- Menéndez, J. A., Arenillas, A., Fidalgo, B., Fernández, Y., Zubizarreta, L., Calvo, E. G., y Bermúdez, J. M. (2010). Microwave heating processes involving carbon materials. *Fuel Processing Technology*, 91(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.08.021>
- Misra, N. N., Schlüter, O., y Cullen, P. J. (2016). Plasma in Food and Agriculture. *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00001-9>
- Monyethabeng, M. M., y Krügel, M. (2016). The effect of UV-C treatment on various spoilage microorganisms inoculated into Rooibos iced tea. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.045>
- Mora, A., Parra, J., Chaverri, J. M., y Arias, M. L. (2013). Determinación de la capacidad antimicrobiana del té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente

- patógenos *Escherichia coli* , *Salmonella enterica* , *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN, 63(3), 247–253.
- Moreno-Vilet, L., Hernández-Hernández, H. M., y Villanueva-Rodríguez, S. J. (2018). Current status of emerging food processing technologies in Latin America: Novel thermal processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50(February), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.013>
- Murakami, E. G., Jackson, L., Madsen, K., y Schickedanz, B. (2006). Factors affecting the ultraviolet inactivation of *Escherichia coli* in apple juice and a model system. *Journal of Food Process Engineering*, 29(1), 53–71. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2006.00049.x>
- Nair, P. M., y Sharma, A. (2016). Food Irradiation. Reference Module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.02950-4>
- Nicholson, W. L., y Galeano, B. (2003). UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: Validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores of *B. anthracis* Sterne. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1327–1330. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1327-1330.2003>
- Ojha, K. S., Tiwari, B. K., y O'Donnell, C. P. (2018). Effect of Ultrasound Technology on Food and Nutritional Quality. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 84, pp. 207–240). <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.01.001>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1981. La comestibilidad de los alimentos irradiados. Serie de Informes Técnicos N° 659. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- Orlowska, M., Koutchma, T., Kostrzynska, M., Tang, J., y Defelice, C. (2014). Evaluation of mixing flow conditions to inactivate *Escherichia coli* in opaque liquids using pilot-scale Taylor-Couette UV unit. *Journal of Food Engineering*, 120(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.020>
- Orlowska, M., Koutchma, T., Grapperhaus, M., Gallagher, J., Schaefer, R., y Defelice, C. (2013). Continuous and pulsed ultraviolet light for nonthermal treatment of liquid foods. Part 1: Effects on quality of fructose solution, apple juice, and milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1580–1592. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0779-8>
- Ozbayoglu, M. E., y Omurlu, C. (2006). Analysis of the effect of eccentricity on flow characteristics of annular flow of non-newtonian fluids using finite element method. 2006 SPE-ICoTA Coiled Tubing and Well Intervention Conference and Exhibition, Proceedings, 293–298. <https://doi.org/10.2523/100147-ms>
- Patar, A., Tanaka, N., y Maeda, H. (2003). Antibacterial Activities of Extracts and Constituents in of Tea Catechins and Soybean Protein. *Japanese Journal of Food Chemistry*, 10(3), 3–6.

- Patil, S., Bourke, P., y Cullen, P. J. (2016). Principles of Nonthermal Plasma Decontamination. Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00006-8>
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1081–1093. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71595-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3)
- Pereda, Julieta, Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Trujillo, A. J. (2008). Effects of ultra-high-pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7125–7130. <https://doi.org/10.1021/jf800972m>
- Pereira, R. V., Bicalho, M. L., Machado, V. S., Lima, S., Teixeira, A. G., Warnick, L. D., y Bicalho, R. C. (2014). Evaluation of the effects of ultraviolet light on bacterial contaminants inoculated into whole milk and colostrum, and on colostrum immunoglobulin G. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2866–2875. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7601>
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., y Dumay, E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 454–463. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001853>
- Pinho, C. R. G., Franchi, M. A., Tribst, A. A. L., y Cristianini, M. (2011). Procedia Food Science Effect of high pressure homogenization process on *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores in skim milk. *Procedia Food Science*, 1, 869–873. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.131>
- Piyasena, P., Dussault, C., Koutchma, T., Ramaswamy, H. S., y Awuah, G. B. (2003). Radio Frequency Heating of Foods: Principles, Applications and Related Properties - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 587–606. <https://doi.org/10.1080/10408690390251129>
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., y Ferragut, V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.004>
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., y Ferragut, V. (2014). Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.01.001>

- Prandtl, L. (1925). "Bericht uber Untersuchungen zur ausgebildeten Turbulenz". Zeitschrift fur angew. Math. u. Mechanik 5.2: 136–139
- Rahn, R. O. (1997). Potassium Iodide as a Chemical Actinometer for 254 nm Radiation: Use of Iodate as an Electron Scavenger. Photochemistry and Photobiology, 66(4), 450–455. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03172.x>
- Ramaswamy, H., y Tang, J. (2008). Microwave and radio frequency heating. Food Science and Technology International, 14(5), 423–427. <https://doi.org/10.1177/1082013208100534>
- Regulation No. 1997/258/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. OJEC, L43, 1-7.
- Reinemann, P. Gouws, T. Cilliers, K. Houck, y and J.R. Bishop. (2006). New Methods for UV Treatment of Milk For Improved Food Safety And Product Quality. 2006 Portland, Oregon. <https://doi.org/10.13031/2013.21493>
- Reverter-Carrión, L., Saucedá-Gálvez, J. N., Codina-Torrella, I., Hernández-Herrero, M. M., Gervilla, R., y Roig-Sagués, A. X. (2018). Inactivation study of *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Aspergillus niger* spores under Ultra-High Pressure Homogenization, UV-C light and their combination. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 48(May), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.011>
- Režek Jambrak, A., Vukušić, T., Donsi, F., Paniwnyk, L., y Djekic, I. (2018). Three Pillars of Novel Nonthermal Food Technologies: Food Safety, Quality, and Environment. Journal of Food Quality, 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/8619707>
- Roberts, T., Baird-Parker, A., & Tompkin, R. (1996). Micro-organisms in Foods. 5. Characteristics of microbial pathogens. London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras: ICMSF, Blackie Academic & Professional.
- Roig-Sagués, A. X., Asto, E., Engers, I., y Hernández-Herrero, M. M. (2015). Improving the efficiency of ultra-high pressure homogenization treatments to inactivate spores of *Alicyclobacillus* spp. in orange juice controlling the inlet temperature. LWT - Food Science and Technology, 63(2), 866–871. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.056>
- Roig-Sagués, A. X., Velázquez, R. M., Montealegre-Agramont, P., López-Pedemonte, T. J., Briñez-Zambrano, W. J., Guamis-López, B., y Hernandez-Herrero, M. M. (2009). Fat content increases the lethality of ultra-high-pressure homogenization on *Listeria monocytogenes* in milk. Journal of Dairy Science, 92(11), 5396–5402. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2495>
- Salas Vicente, Fidel; Salas Vicente, José; Guamis Alegre, Alex; Guamis Alegre, David y Moreta Buñill, Leo. (2017). System and method for sterilizing a fluid. UE Patente Application EP 2 965 766 B2

https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20170412&DB=&locale=en_EP&CC=EP&NR=2965766B1&KC=B1&ND=5

- Sastry, S. (2008). Ohmic heating and moderate electric field processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 419–422. <https://doi.org/10.1177/1082013208098813>
- Sauceda-Gálvez, J. N., Roca-Couso, R., Martínez-García, M., Hernández-Herrero, M. M., Gervilla, R., y Roig-Sagués, A. X. (2019). Inactivation of ascospores of *Talaromyces macrosporus* and *Neosartorya spinosa* by UV-C, UHPH and their combination in clarified apple juice. *Food Control*, 98, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.002>
- Sawai, Jun; Fujisawa, Miffo; Kokugan, Takao; Shimizu, Masaru; Igarashi, Hideo; Hashimoto, Atsushi; Kojima, H. (1996). Pasteurization of bacterial spores in liquid medium by far-infrared irradiation. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 30(1), 170–172.
- Shimamura, T., Zhao, W., y Hu, Z. (2007). Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Anti- infective Agent, 57–62.
- Sommer, R., Cabaj, A., Sandu, T., y Lhotsky, M. (1999). Measurement of UV radiation using suspensions of microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 53(1–3), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00113-X)
- Suárez-Jacobo, Á., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X., Saldo, J. (2010). Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice. A preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.011>
- Subdirección General de Fomento Industria e Innovación. (2015). Principales indicadores y ratios más significativos de la Industria Alimentaria Española. MAGRAMA.
- Sun, H., Kawamura, S., Himoto, J., Itoh, K., Wada, T., y Kimura, T. (2008). Effects of Ohmic Heating on Microbial Counts and Denaturation of Proteins in Milk. *Food Science and Technology Research*, 14(2), 117–123. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.117>
- Steenbock, H. 1928. Antirachitic product and process. US Patent 1.680.818.
- Tang, J. (2015). Unlocking Potentials of Microwaves for Food Safety and Quality. *Journal of Food Science*, 80(8), E1776–E1793. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12959>
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., y Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427–439. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00051-7)
- Toledo, R. T. (2006). Fundamentals of Food Process Engineering. *International Journal of Food Science y Technology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01646.x>

- U.S. FDA. 2001. Code of federal regulations. 21 CFR Title 21 Volume 3. 21 cfr part 179. 39. Irradiation in the production, processing and handling of food
- Valencia Flores, D. C. (2015). Aplicación de la ultra alta presión de homogenización (UHPH) en la elaboración de licuados vegetales de almendra de alta calidad. TDX (Tesis Doctorals En Xarxa), 162. <http://www.tdx.cat/handle/10803/305099>
- Vuong, Q. V., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., Golding, J. B., y Roach, P. D. (2011). Isolation of green tea catechins and their utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 27(3), 227–247. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.563397>
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Jellema, A., & van Boekel, M. (1999). *Dairy Technology. Principles of milk—Properties and processes*. New York-Basel: Marcel Dekker, Inc.
- Wang, L., Gong, L. H., Chen, C. J., Han, H. B., y Li, H. H. (2012). Column-chromatographic extraction and separation of polyphenols, caffeine and theanine from green tea. *Food Chemistry*, 131(4), 1539–1545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.129>
- Wang, M. S., Wang, L. H., Bekhit, A. E. D. A., Yang, J., Hou, Z. P., Wang, Y. Z., ... Zeng, X. A. (2018). A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing. *Journal of Food Engineering*, 223, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.035>
- WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization (Vol. 46). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.009>
- Xuan, X.-T., Ding, T., Li, J., Ahn, J.-H., Zhao, Y., Chen, S.-G., ... Liu, D.-H. (2017). Estimation of growth parameters of *Listeria monocytogenes* after sublethal heat and slightly acidic electrolyzed water (SAEW) treatment. *Food Control*, 71, 17–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.018>
- Yin, F., Zhu, Y., Koutchma, T., y Gong, J. (2015). Inactivation and potential reactivation of pathogenic *Escherichia coli* O157: H7 in bovine milk exposed to three monochromatic ultraviolet UVC lights. *Food Microbiology*, 49, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.014>
- Yousefzadeh, S., Matin, A. R., Ahmadi, E., Sabeti, Z., Alimohammadi, M., Aslani, H., y Nabizadeh, R. (2018). Response surface methodology as a tool for modeling and optimization of *Bacillus subtilis* spores inactivation by UV/ nano-Fe0 process for safe water production. *Food and Chemical Toxicology*, 114(5), 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.045>
- Zhang, Y., Zhou, L., y Zhang, Y. (2014). Investigation of UV-TiO2 photocatalysis and its mechanism in *Bacillus subtilis* spore inactivation. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26(9), 1943–1948. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.007>

Zhao, W., Yang, R., Shen, X., Zhang, S., y Chen, X. (2013). Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control*, 32(1), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.029>