



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN	5
	2.1 Nuevas tecnologías de inactivación microbiana	6
	2.2 Pulsos de luz	7
	2.2.1 Principios de la tecnología	7
	2.2.2 Situación actual	8
	2.2.3 Parámetros de proceso	8
	2.3 Efecto sobre los microorganismos	9
	2.3.1 Mecanismo de acción.....	9
	2.3.2 Sensibilidad de los microorganismos a los pulsos de luz	10
	2.3.3 Factores que afectan a la efectividad del tratamiento	11
3	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
4	MATERIAL Y MÉTODOS	15
	4.1 Medios de cultivo y tratamiento	15
	4.2 Microorganismos y suspensiones	15
	4.3 Equipo	16
	4.3.1 Instalación y funcionamiento	16
	4.3.2 Caracterización de los parámetros de temperatura, fluencia e iluminancia.....	18
	4.4 Recuento de supervivientes y construcción de curvas de supervivencia .	20
	4.5 Análisis estadístico.....	21
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
	5.1 Efecto del tipo de microorganismo en la eficacia letal de los pulsos de luz.....	22
	5.2 Efecto del pH del medio en la eficacia letal de los pulsos de luz	25
	5.3 Efecto del tratamiento mediante pulsos de luz en distintos productos alimentarios	28
6	CONCLUSIONES	33
7	APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE	35
8	BIBLIOGRAFÍA	36

1. RESUMEN

El tratamiento por pulsos de luz es una técnica de inactivación de microorganismos considerada como nueva. Su aplicación afecta mínimamente a los componentes de los alimentos, por lo que puede favorecer la puesta en el mercado de productos estables y seguros con un alto nivel de calidad nutricional y organoléptica.

Los equipos existentes en la actualidad tienen un elevado coste, hecho que junto con el escaso conocimiento acerca de los factores que pueden afectar a su eficacia letal, dificulta su introducción en el ámbito de la conservación de los alimentos.

El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de una instalación de bajo coste que permitiese la aplicación de pulsos de luz y evaluar la eficacia letal sobre distintos grupos microbianos y en distintos medios, con una misma metodología.

Para ello se adaptó un equipo comercial de bajo coste que utiliza una lámpara de xenón para otras aplicaciones, con el fin de inactivar microorganismos. Tras ello, se procedió a aplicar diferentes intensidades de tratamiento dependiendo de la cantidad de pulsos administrados (0, 10, 20, 50 100 y 200 pulsos) a todas las muestras, variando el microorganismo inoculado y el pH del medio de tratamiento. Posteriormente, el tratamiento fue aplicado sobre unas muestras de caldo de cocido, caldo de verduras, zumo de naranja y leche entera inoculadas con el microorganismo *Escherichia coli* BW 25113.

Este trabajo demostró que el equipo desarrollado permite aplicar tratamientos letales mediante pulsos de luz, cuya eficacia dependió del tipo de microorganismo. Igualmente se pudo comprobar que puede ser una alternativa para poder aplicar tratamientos basados en esta técnica sobre diferentes productos alimentarios.

ABSTRACT

Pulsed light (PL) is a new method for microbial inactivation, which hardly affects the quality of the food. Thus it could contribute to introduce in the market food with high levels of nutritional and organoleptic characteristics.

However, equipments based on PL technology have a high cost. This, together with our scarce knowledge about the factors that impact its efficacy, is a handicap for the introduction of such technology as a food preservation strategy against microorganisms.

The aim of this study was the development and evaluation of a low cost equipment allowing the application of pulsed light, as well as evaluating its lethality on different species of microorganisms and the influence of distinct factors on the microbial lethality.

A low cost commercial apparatus equipped with a Xenon-lamp used for other applications was adapted to inactivate microorganisms under distinct treatment conditions. We applied different intensities of the treatment, according to the number of pulses (0, 10, 20, 50, 100, and 200), over different species of microorganisms and at different pH. Furthermore, the treatment was applied to samples of chicken and vegetable broth, orange juice, and whole milk, inoculated with *Escherichia coli* BW 25113.

This study demonstrated that the device permitted to inactivate several Log₁₀ cycles of the population of different microorganisms based on PL. Lethality depended mainly on the type of microorganism. In the same way, it was demonstrated that PL is an adequate method to reduce the concentration of microorganisms in several products.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Nuevas tecnologías de inactivación microbiana

Los alimentos pierden calidad desde el momento que son cosechados u obtenidos a través de cambios que son consecuencia de reacciones físicas, químicas o microbiológicas. La conservación de alimentos es una lucha continua contra los microorganismos y elementos que deterioran los alimentos o los hacen inseguros. Los microorganismos y las enzimas son los principales agentes responsables del deterioro y deben por tanto ser los objetivos de las técnicas de conservación.

Actualmente, dentro de este campo, la investigación en la Industria Alimentaria se dirige a reemplazar las técnicas tradicionales de conservación de alimentos (tratamientos térmicos intensos, salado, acidificación, desecación y conservación química) por nuevas técnicas que se adapten mejor al tipo de alimentos demandados por el consumidor: de alta calidad, nutritivos, naturales, seguros pero poco procesados, libres de conservantes, de larga vida útil y fáciles de preparar. Por ello, un método conservación ideal debería poseer las siguientes características:

- Incrementar la seguridad y la durabilidad del producto inactivando microorganismos patógenos y alterantes, y enzimas de interés.
- No debe modificar los atributos organolépticos y nutricionales del alimento.
- No debe dejar residuos.
- Debe ser barato y de fácil manejo.
- No debe tener nada objetable por consumidores y legisladores.

Existen diversas tecnologías emergentes de conservación de los alimentos, algunas de las cuales se están utilizando ya a nivel industrial. A continuación se enumeran las más importantes.

El procesado por altas **presiones hidrostáticas (HHP)** supone exponer el alimento a altas presiones (100-1000 MPa) durante unos pocos minutos (Gervilla et al., 2000). Este tratamiento tiene un efecto letal significativo sobre células vegetativas de levaduras y bacterias; sin embargo, los esporos pueden presentar resistencia. Ya existen en el mercado productos comercializados con esta técnica como zumos o determinados productos cárnicos.

Radiaciones ionizantes: Método físico de conservación que consiste en exponer el producto a radiaciones ionizantes como los rayos X, gamma o electrones acelerados. Es efectivo contra células vegetativas y esporos, aunque a dosis elevadas de radiación. En la actualidad, la legislación española solamente permite aplicar este tipo de tratamientos en especias y hierbas aromáticas deshidratadas (10 kGrays).

El tratamiento por **pulsos eléctricos de alto voltaje** se basa en la aplicación de pulsos de alta intensidad de campo eléctrico (1-55 kV/cm) durante unos pocos mili o microsegundos (Jeantet et al., 1999). Esta técnica tiene efecto en células vegetativas de levaduras y bacterias, pero no frente a esporos, por lo que su aplicación se centra en la pasteurización de alimentos líquidos, como el caso de los zumos de frutas.

Los **ultrasonidos** son ondas sonoras con frecuencias superiores a las perceptibles por el oído humano (normalmente mayores a 16 kHz), la aplicación de ultrasonidos a medios líquidos se conoce como sonicación. Durante su propagación se producen zonas alternadas de compresión del medio y, si el ultrasonido tiene suficiente energía, puede producirse cavitación, fenómeno que afecta y daña las estructuras celulares de los microorganismos (Raso et al., 1998). Tienen efecto tanto en levaduras y bacterias como en esporos, aunque su efecto en estos últimos es menor. Actualmente se está investigando su aplicación en alimentos líquidos como zumos o leche.

La **radiación ultravioleta (UV)** es una radiación no ionizante que presenta propiedades germicidas especialmente en el rango 200-280 nm (Kuo et al., 1997; Bintsis et al., 2000). Esta técnica tiene efecto en células vegetativas, así como en esporos bacterianos. Se está estudiando su aplicación en la higienización de alimentos líquidos o en el tratamiento de superficies de alimentos o de aquellas que están en contacto con los alimentos.

La utilización de **pulsos de luz** de alta intensidad (**PL**) es una técnica donde se utilizan picos de energía que son disipados en la fuente de luz en tiempos de energización extremadamente pequeños (aproximadamente 1 μ s). Se ha demostrado su efecto letal sobre células vegetativas de levaduras y bacterias, así como sobre esporos (Rowan et al., 1999). Su efecto está basado en la radiación UV liberada como se comentará más adelante.

La aplicación más exitosa de las tecnologías emergentes de conservación de los alimentos es probablemente la **tecnología de las barreras**, que consiste en la aplicación sucesiva o simultánea de varios tratamientos individuales de baja

intensidad. Esta combinación de varios tratamientos subletales permite la protección deseada del alimento y por tanto del consumidor contra microorganismos patógenos o alterantes afectando mínimamente en la calidad de los alimentos.

2.2. Pulsos de luz

2.2.1 Principios de la tecnología

La luz pulsada o pulsos de luz (PL) es una tecnología no térmica de procesamiento que consiste en la aplicación de destellos, flashes o pulsos sucesivos de luz de alta energía y amplio espectro de emisión sobre la superficie a tratar.

Generalmente, los equipos de luz pulsada se componen de una o más lámparas de xenón, una unidad eléctrica con un condensador de energía eléctrica y conmutadores de alto voltaje (uno por lámpara) y un módulo de control. Para la emisión de cada pulso de luz, la energía eléctrica se acumula en un condensador, magnificándose así la potencia eléctrica, para posteriormente ser liberada muy rápidamente en la lámpara de xenón. Esta lámpara emite entonces un flash de luz muy intenso que se propaga en todas las direcciones. Mediante el uso de reflectores la luz emitida es redirigida a la zona de tratamiento donde está situado el producto a tratar.

El espectro de luz emitida en cada pulso se extiende desde el ultravioleta lejano (190 nm) hasta la región del infrarrojo cercano (1000 nm), por lo que contiene una proporción considerable de luz ultravioleta (Dunn et al., 1997b; Wekhof 2000). Alrededor del 20% del total de la luz emitida corresponde al espectro UV-C (200 – 280 nm), siendo menor el contenido en UV-B (280 – 320 nm) y UV-A (320 – 400 nm), que constituyen alrededor del 8% y 12% del total, respectivamente (Wekhof 2000). Además de por su amplio espectro de emisión, los pulsos de luz se caracterizan también por su corta duración (Dunn et al., 1989) que puede oscilar entre los 100 y 350 μ s.

Aunque el pico de energía emitido en cada pulso es elevado, el requerimiento energético total de este proceso es moderado debido a su corta duración, por lo que el tratamiento mediante luz pulsada podría considerarse económico (Dunn et al., 1995).

Además, la aplicación de este tratamiento no genera ningún tipo de residuo ni implica el uso de sustancias químicas que puedan suponer riesgos potenciales a nivel medioambiental y de salud (Gómez-López et al., 2007; Pereira & Vicente, 2010).

2.2.2 Situación actual

Aunque el conocimiento acerca de la tecnología de la luz pulsada se ha incrementado de manera notable durante los últimos años, su aplicación a nivel industrial es aún muy limitada. En Estados Unidos, la empresa *Dole Food Company* comercializa champiñones Portobello enriquecidos en vitamina D gracias a la aplicación de luz pulsada. En Europa, existen en el mercado diversas empresas que comercializan equipos para el tratamiento de envases y tapones alimentarios (Claranor, Montena EMC, etc.). Sin embargo, su aplicación para el tratamiento de alimentos a nivel industrial no ha sido factible hasta el momento. Por ello, sigue siendo necesario un mayor conocimiento e investigación, a fin de validar la eficacia de la luz pulsada para la descontaminación y/o conservación de alimentos, así como para la mejora de la calidad de los productos o el desarrollo de otros nuevos, y hacer posible de manera más eficaz la transferencia de esta tecnología a la industria alimentaria.

2.2.3 Parámetros de proceso

El conocimiento de los parámetros del tratamiento más importantes de los PL ha mejorado notablemente en las últimas décadas. A continuación se describen los principales parámetros que caracterizan el tratamiento:

- Potencia radiante emitida (P): Es la potencia total emitida en cada pulso desde una lámpara (en este caso de xenón) de una determinada superficie de emisión y en todas las direcciones. La unidad de medida en el SI es el W/m^2 . A menudo se utilizan W/cm^2 y $\mu W/cm^2$.
- Frecuencia (f): Es el número de pulsos emitidos por la lámpara de xenón por unidad de tiempo. La unidad de medida en el SI es el hercio ($Hz = 1/s$).
- Velocidad de fluencia o irradiancia (E): Es la potencia radiante de todas las longitudes de onda incidentes sobre un objeto irradiado. Cuando la potencia es constante sobre toda el área (S) del objeto, es el cociente entre la potencia radiante y la superficie del objeto ($E = P/S$). La unidad de medida del SI es el W/m^2 . A menudo se utilizan W/cm^2 y $\mu W/cm^2$.
- Tiempo de exposición (t): Es la duración de la exposición a la radiación. La unidad de medida en el SI segundo (s). Se determina multiplicando la duración de un pulso por el número de pulsos totales.

- Fluencia total o dosis (H): Es el producto de la fluencia recibida por un objeto por el tiempo de exposición ($H = E \times t$). La unidad de medida en el SI es el J/m^2 . A menudo se utilizan J/cm^2 y mJ/cm^2 .

Si bien no es un parámetro típico para caracterizar los tratamientos de PL, en este trabajo, también se ha medido la iluminancia que es la cantidad de flujo luminoso visible que incide sobre una superficie por unidad de área. La unidad de medida en el SI es el Lux.

En general, se considera que los tratamientos de PL son más efectivos cuanto mayor es la energía radiante absorbida por el objeto a tratar. Esta depende de la fluencia emitida por la fuente de luz, el número de pulsos aplicados al objeto a tratar y el coeficiente de absorción del mismo, que es un parámetro que refleja la cantidad de radiación UV absorbida por el medio y es un indicativo de la capacidad de penetración de la luz UV en el medio (se mide en cm^{-1}). Generalmente a menor coeficiente de absorción del objeto, mayor efecto tiene el tratamiento sobre los microorganismos porque mayor cantidad de fotones son capaces de alcanzar a los componentes vitales de los mismos.

2.3 Efecto sobre los microorganismos

2.3.1 Mecanismo de acción

El efecto de la luz pulsada se debe a la absorción de las longitudes de onda UV por el ADN microbiano, lo que origina roturas en la cadena y la formación de dímeros de pirimidina (Takeshita et al., 2003; Farrell et al., 2011; Artíguez et al., 2013). Estas lesiones inhiben la replicación del ADN, causando la inactivación de los microorganismos debido a su incapacidad para multiplicarse (Jenkins 1985). La intensidad del daño producido en el material genético es superior cuando la luz UV se aplica en forma de pulsos, en lugar de en forma continua. Por otra parte se ha observado que en microorganismos tratados con luz pulsada se produce una mayor salida de proteína intracelular y grandes daños estructurales, en comparación a la luz UV aplicada de forma continua (Takeshita et al., 2003). Estos daños consisten en la expansión de vacuolas, distorsión de la membrana y cambios en la geometría celular. El mecanismo de acción en el caso de los daños estructurales es debido al rápido sobrecalentamiento del microorganismo por la elevada energía transmitida por pulso de luz, con respecto a la velocidad de enfriamiento por cesión de calor al medio o a la

superficie sobre la que se encuentre adsorbido o soportado el microorganismo (Figura 1).

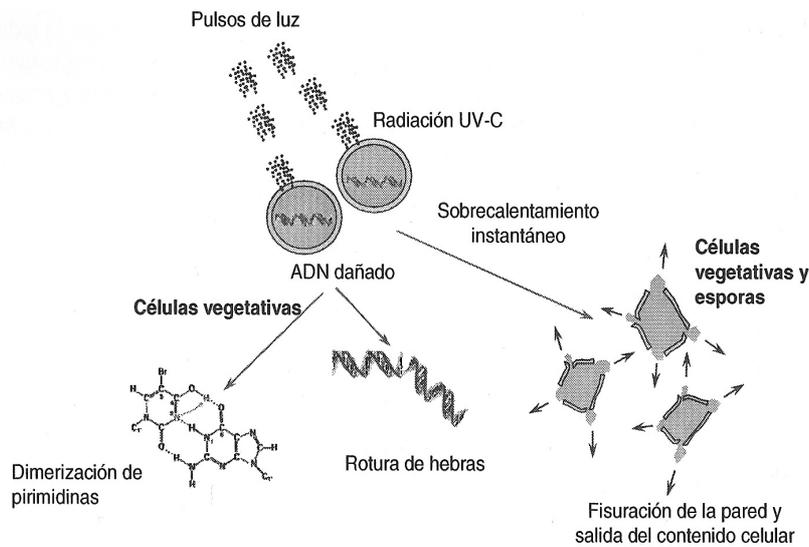


Figura 2.3.1. Daños celulares producidos por la aplicación de pulsos de luz estructurales y a nivel genético (adaptado de Morata-Barrado, 2008)

2.3.2 Sensibilidad de los microorganismos a los pulsos de luz

Los pulsos de luz se han mostrado eficaces en la inactivación tanto de células vegetativas como de esporos bacterianos.

Rowan et al (1999) estudiaron la sensibilidad a pulsos de luz de 7 microorganismos patógenos o alterantes de alimentos inoculados a una concentración de 10^9 ufc/ml en medios de laboratorio. Utilizaron 100 y 200 pulsos de 85 ns de duración, 35 MW de potencia de pico por pulso con una fluencia de $1,48 \text{ mJ/cm}^2$ y observaron el siguiente orden de resistencia para los microorganismos (en orden decreciente): *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *B. cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *P. aeruginosa* (Tabla 1), aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre *S. aureus* y *S. enteritidis* y entre *B. cereus* y *S. cerevisiae*. En promedio se puede decir que la reducción de la población inicial obtenida fue de 5-6 Log_{10} tras 200 pulsos y para todos los microorganismos estudiados.

Para comprobar que la eficacia letal se debía al componente de luz UV, los autores utilizaron dos tipos de fuentes de luz. La primera era transparente para la luz UV (alto UV) y la segunda tenía una envoltura que restringía la salida de luz en la región de UV (bajo UV).

Tabla 2.3.2.1. Influencia de diferentes tratamientos de luz pulsada en la inactivación de distintas especies de microorganismos vegetativos (adaptado de Rowan et al, 1999). Los resultados corresponden a Log_{10} ufc/placa supervivientes a los tratamientos.

Microorganismo	Control -	Alto UV		Bajo UV	
		Número de pulsos		Número de pulsos	
		100	200	100	200
<i>B. cereus</i>	8,3±0,1	4,5±0,3	3,4±0,3	8,0	7,9±0,4
<i>L. monocytogenes</i>	9,4±0,2	5,8±0,4	5,0±0,2	9,3±0,1	9,2±0,1
<i>S. aureus</i>	9,4±0,1	5,2±0,3	4,3±0,1	8,9±0,2	8,1±0,4
<i>E. coli</i>	9,6±0,3	4,5±0,1	3,4±0,1	9,1±0,1	7,8±0,2
<i>S. enteritidis</i>	9,7±0,2	5,2	4,1±0,2	9,1±0,2	8,1±0,1
<i>P. auruginosa</i>	8,7±0,1	4,3±0,2	2,9±0,3	6,9±0,3	6,5±0,1
<i>S. cerevisiae</i>	8,4±0,2	4,7±0,2	3,5±0,1	8,0±0,3	7,7±0,2

Se considera que la sensibilidad de las bacterias frente a la luz pulsada depende del tipo de envoltura que presentan, siendo en general las bacterias Gram positivas más resistentes que las Gram negativas (MacGregor et al., 1998; Rowan et al., 1999), si bien algunos autores no han encontrado un patrón definido de resistencia al estudiar numerosos grupos microbianos (Gómez-López et al., 2005).

Además, dentro de las bacterias Gram positivas se han descrito también especies con mayor resistencia frente al tratamiento de luz pulsada. Concretamente, *L. monocytogenes* ha sido señalada como una de las especies más resistentes al tratamiento entre las 27 especies microbianas estudiadas (Gómez-López et al., 2005). Este estudio también demostró la eficacia del tratamiento contra esporos bacterianos. Mediante un tratamiento con una intensidad de pulso de 7 J y una duración de pulso de 30 μs se logró en *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus circulans* y *Bacillus cereus* un nivel de inactivación de $2,5 \pm 0,4$, $3,7 \pm 0,3$ y $> 5,9$ (este último por encima del límite de detección), respectivamente.

2.3.3 Factores que afectan a la efectividad del tratamiento

La inactivación de microorganismos mediante luz pulsada depende también de las características del producto y, en particular, de sus propiedades ópticas. Los procesos de absorción, reflexión y dispersión de la luz por el sustrato determinan la energía radiante que alcanza a los microorganismos y, con ello, la eficacia del proceso

La composición del sustrato puede afectar a la eficacia del procesado mediante luz pulsada, ya que ciertos componentes pueden influir en las propiedades ópticas del producto y disminuir la luz que llega a los microorganismos. Esto es especialmente importante en alimentos líquidos, en los que la radiación puede ser absorbida por distintos componentes. En esta línea, Roberts y Hope (2003) demostraron que la inactivación de virus en medios con un alto contenido en proteínas es menor que en medios acuosos simples. La grasa de la leche también reduce en cierta medida la eficacia de la luz pulsada (Miller et al., 2012), efecto que fue relacionado con la dispersión de la luz de dicho componente. Es decir, a mayor complejidad del sustrato a tratar, menor efecto tiene esta técnica.

No obstante no existe mucha información acerca de la posible influencia de las características del producto en la eficacia letal de la luz pulsada, en consecuencia, será necesario obtener un mayor conocimiento al respecto. Además, la identificación de las propiedades del sustrato que deben cuantificarse para caracterizar la exposición microbiana a la luz emitida podría permitir a su vez, establecer de manera precisa la intensidad de tratamiento necesaria para garantizar un determinado nivel de inactivación en cada producto.

La presencia de sólidos o partículas en suspensión en el líquido a tratar (turbidez) pueden producir un “efecto sombra” sobre los microorganismos. Estas partículas pueden absorber o reflejar parte de la luz incidente sobre la muestra y reducir, por tanto, la cantidad de luz que alcanza a los microorganismos situados en capas inferiores. Por ejemplo, la presencia de sólidos en leche concentrada limita la penetración de la luz, disminuyendo por tanto, la inactivación de la luz pulsada (Miller et al., 2012). El “efecto sombra” puede producirse también en las superficies de los alimentos sólidos por la presencia de fisuras, porosidades e irregularidades que pueden proteger a los microorganismos, reduciendo de esta forma la eficacia de inactivación (Roberts & Hope, 2003).

3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, existe una gran preocupación por parte de los consumidores por la seguridad de los alimentos que consumen. Existen numerosas técnicas que pueden garantizar la producción de alimentos que cumplan con estas pretensiones en materia de seguridad alimentaria. La principal estrategia de conservación de los alimentos basada en la inactivación microbiana, el calor, afecta también a componentes que determinan su calidad nutricional y organoléptica. Por esta razón, se están desarrollando nuevas estrategias que permitan poner en el mercado productos sanitariamente seguros y estables con unas características lo más parecidas al producto fresco. Una de estas estrategias podría ser la aplicación de pulsos de luz (PL).

El tratamiento mediante PL consiste en la aplicación de sucesivos pulsos de luz blanca (de 200 nm a 1000 nm) con una duración de unos 325 μ s por pulso sobre la superficie del producto que se encuentra en la cámara de tratamiento, utilizando para ello lámparas de xenón que liberan muy rápidamente la energía eléctrica en forma de luz.

Si bien ya existe cierta documentación científica sobre el efecto de los PL en la inactivación microbiana, estas investigaciones se han realizado con equipos de elevado coste (muchas veces superior a los 10,000 euros para las instalaciones más baratas y que permite procesar en tratamientos discontinuos pequeñas cantidades de producto). Por otro lado, falta también realizar un estudio sistemático de distintos factores que puedan influir en la eficacia letal del proceso que permita evaluar y comparar los resultados.

Es por ello que el **objetivo** de este trabajo es el de poner a punto una instalación de bajo coste que permita la aplicación de PL y evaluar la eficacia letal sobre distintos grupos microbianos y en distintos medios, con una misma metodología que permita realizar comparaciones adecuadas.

Para ello se fijaron los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar una instalación para aplicar pulsos de luz y caracterizar los parámetros de tratamiento más importantes.
- Evaluar la influencia del tipo de microorganismo en la eficacia letal de la tecnología.

- Evaluar la influencia del pH del medio en la eficacia de inactivación de los diferentes microorganismos tratados.
- Determinar la eficacia del tratamiento por pulsos de luz en diferentes productos alimentarios.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Medios de cultivo y tratamiento

Como **medios de cultivo** se han usado agar tripticasa-soja (TSA) y caldo tripticasa-soja (TSB) suplementados con 0,6% p/v de extracto de levadura (EL), suministrados por la firma Oxoid (Madrid, España), y preparados siguiendo las instrucciones del fabricante. También se ha usado agar patata-dextrosa (PDA) y caldo Sabouraud dextrosa también preparados siguiendo las instrucciones del fabricante. Como **medios de tratamiento** se utilizó tampón citrato-fosfato (McIlvaine) de pH 7,0 y pH 4,0. Tras su preparación, todos estos medios se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C en un autoclave (modelo Darlba K-400, Terrassa, Barcelona) y se almacenaron a temperatura ambiente, evitando su contacto con la luz, hasta su uso. También se utilizaron como medios de tratamiento una serie de productos alimentarios esterilizados comercialmente, y de distintas características (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1. Características de los productos alimentarios utilizados como medios de tratamiento a lo largo de la investigación. (Adaptado de Gayán, 2013).

Producto	pH	Potencial redox (mV)	Coef. de absorción (cm ⁻¹)	Turbidez (NTU)
Caldo de cocido	5,33	143	22,15	3425,3
Caldo de verduras	6,02	139	27,67	2315,4
Zumo de naranja	3,56	52	81,65	4195,0
Leche entera	6,76	201	247,9	37.300,0

4.2 Microorganismos y suspensiones

En esta investigación se usaron 7 microorganismos de diferentes características (Tabla 4.2.1). Se utilizaron 4 especies de bacterias vegetativas (dos Gram positivas: *Listeria monocytogenes* 4032 y *Staphylococcus aureus* 4459; y dos Gram negativas: *Escherichia coli* BW 25113 y *Salmonella typhimurium* 878), una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* Levuline CHP (preparado comercial)), y dos especies de bacterias esporuladas (*Bacillus subtilis* 38 y *Bacillus stearothermophilus* 48).

Las cepas se mantuvieron en crioviales (Scharlau, Barcelona, España) a -80°C. A partir de estos crioviales se sembraron placas de TSA-EL y PDA por agotamiento en estría que se incubaron a la temperatura correspondiente (Tabla 4.2.1). A partir de una colonia aislada se realizaron los precultivos, a partir de los cuales se inocularon

frascos de vidrio con 50 ml de TSB-EL y Sabouraud dextrosa. Inmediatamente tras la siembra, los frascos se incubaron en agitación continua a 130 rpm (Heidolph, Vibramax 100, Schwabach, Alemania), siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 4.2.1., en una estufa de aire forzado (Selecta, Modelo Hotcold UL, Barcelona, España). En el caso de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus* no fueron necesarios estos pasos previos para poder obtener el cultivo, ya que se utilizaron suspensiones de esporos previamente disponibles en el laboratorio, y almacenadas en condiciones de refrigeración.

Tabla 4.2.1. Microorganismos utilizados y sus condiciones de crecimiento y recuperación tras el tratamiento.

Microorganismo	Caldo	Agar	Cultivo	Recuperación
<i>Escherichia coli</i>	TSB	TSA	37 °C / 24 horas	35 °C / 24 horas
<i>Salmonella typhimurium</i>	TSB	TSA	37 °C / 24 horas	35 °C / 24 horas
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSB	TSA	37 °C / 24 horas	35 °C / 24 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	TSA	37 °C / 24 horas	35 °C / 24 horas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sabouraud dextrosa	PDA	25 °C / 48 horas	25 °C / 48 horas
<i>B. subtilis</i> (esporos)	-	TSA	-	35 °C / 24 horas
<i>B. stearothermophilus</i> (esporos)	-	TSA	-	55 °C / 24 horas

4.3 Equipo

4.3.1 Instalación y funcionamiento

El equipo base se trata de un fotodepilador (*Me Elos Super Touch*, EE.UU.) con un voltaje de 220 V que utiliza una lámpara de xenón de 9 J/cm² y que dispone de un filtro protector frente a la luz UV para evitar dañar las células de la piel. Para este trabajo, se eliminó dicho filtro. Con el fin de reducir las pérdidas por dispersión de la luz y maximizar la cantidad de luz pulsada sobre la muestra, la lámpara se instaló en la parte superior de una cámara rectangular de 44 cm de largo por 25 cm de ancho y 27 cm de alto, de paredes opacas cuyas caras interiores se cubrieron completamente con una superficie de espejos. La cámara dispone de una puerta que permite la colocación de la muestra en la zona de tratamiento, disponiendo de un cierre que

impide la salida de luz de la zona de exposición. Las figuras 4.3.1.1 y 4.3.1.2 incluyen una fotografía y un esquema de la instalación desarrollada, respectivamente.



Figura 4.3.1.1. Instalación de pulsos de luz.

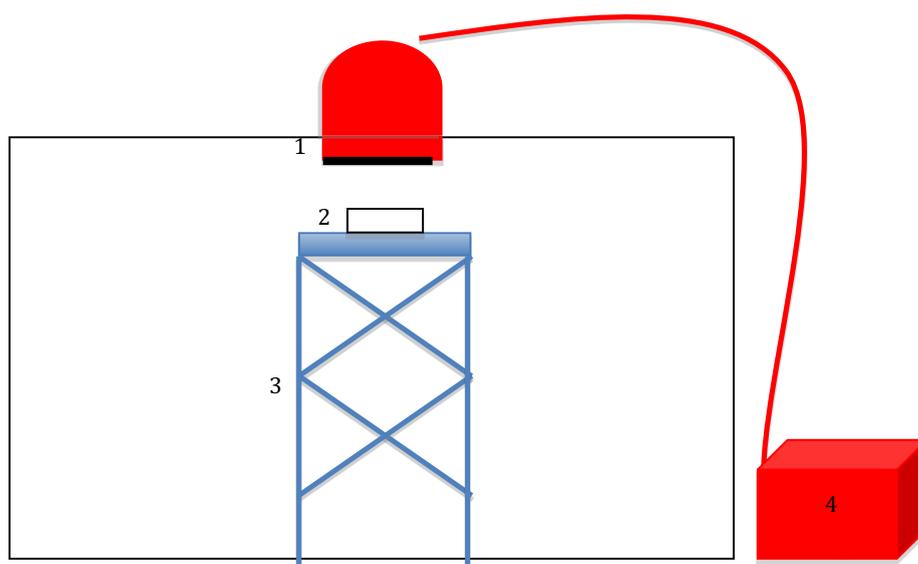


Figura 4.3.1.2. Esquema de la instalación de pulsos de luz. (1) Lámpara de xenón, (2) placa de Petri con la muestra a tratar, (3) soporte regulable, (4) generador de pulsos de luz.

Para realizar este estudio, se situó una muestra de 100 μ l, en forma de gota, de la suspensión microbiana previamente centrifugada, resuspendida y diluida en tampón citrato-fosfato (McIlvaine) de pH 7,0 o pH 4,0 o en el alimento correspondiente, en una placa de Petri con capacidad para 20 ml. Esta placa se introdujo dentro del equipo, a una distancia (3 cm) y posición fija con respecto a la lámpara de

tratamiento, y se procedió a aplicar el tratamiento correspondiente (0, 10, 20, 50, 100, y 200 pulsos) a temperatura ambiente. Si bien no fue objeto de estudio, el equipo permite regular la distancia de exposición de la muestra a la lámpara de xenón.

Para asegurar un recuento de supervivientes adecuado tras el tratamiento, cada tipo de microorganismo se diluía convenientemente antes de ser depositado en la placa de Petri. Para ello se contaba el número de microorganismos presentes en la suspensión microbiana mediante un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Japón) y una cámara de recuento (cámara de Thoma). Las suspensiones se diluían entre 1/100000 y 1/1000 para ser sometidas al tratamiento de pulsos de luz, dependiendo del recuento microscópico estimado.

4.3.2 Caracterización de los parámetros de temperatura, fluencia e iluminancia

Con objeto de caracterizar la intensidad de tratamiento aplicada, se llevaron a cabo medidas de la fluencia mediante un radiómetro a 254 nm (*UVX Radiometer*, UVP California, EE.UU.), cuyo sensor se colocó en la misma posición y distancia que la muestra a tratar. De la misma manera, se colocó la sonda para poder medir la cantidad de flujo luminoso (iluminancia) a 560 nm producido por la lámpara del equipo (*Lux Probe Head Type FLA603VL4*, Ahlborn, Alemania). También, se midió la evolución de la temperatura durante el tiempo de tratamiento. Para ello, se colocó una sonda termopar K (Ahlborn, Alemania) en el centro de una placa de Petri. Sobre la sonda, se vertieron 100 µl de agua con el fin de emular una muestra a tratar. De esta manera, se registró la temperatura de la muestra tras la aplicación de distintos número de pulsos hasta un máximo de 150 pulsos.

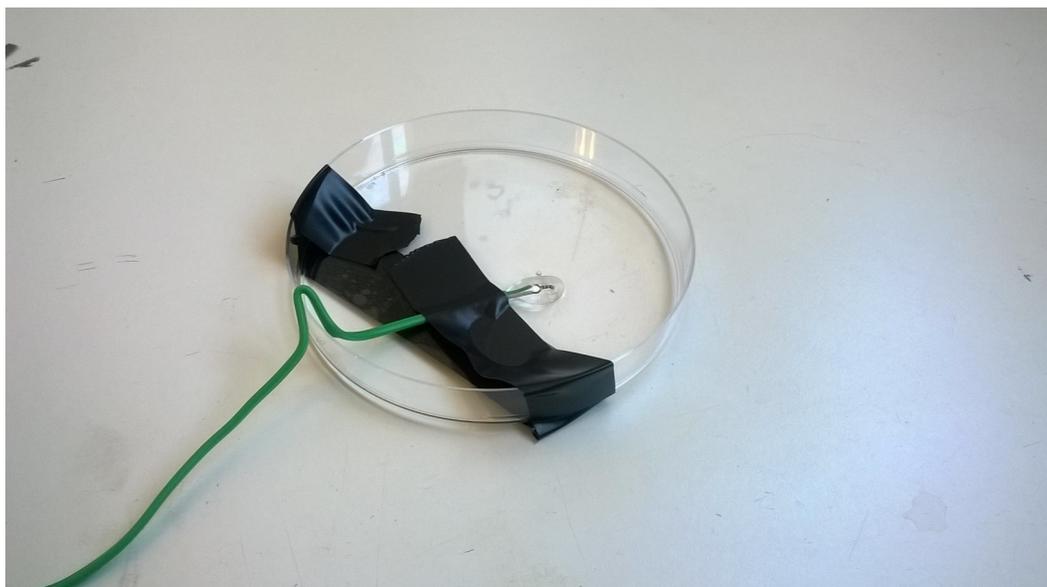


Figura 4.3.2.1. Sonda de medida de la temperatura (termopar K) durante el tratamiento.

La Figura 4.3.2.2. muestra los valores de fluencia, iluminancia y la temperatura de la muestra tras la aplicación de distinto número de PL. Como se observa, la fluencia (cuya longitud de onda se encuentra en 254 nm, dentro del rango de la luz UV-C considerada la responsable de la inactivación microbiana) no varió de manera considerable durante el tratamiento obteniéndose una medida de unos $125 \pm 5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Es importante señalar que esta fluencia fue casi 10 veces superior que la conseguida por una lámpara de luz UV-C de 8 W de baja presión de mercurio ($13,4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Por el contrario, la cantidad de iluminancia (560 nm) aumentó a medida que transcurría el tiempo de tratamiento. Ese incremento en la iluminancia podría ser debido a que la lámpara se va calentando conforme aplica pulsos haciendo que sea progresivamente más eficiente, como ya ha sido descrito en algunas lámparas como en el caso de las de baja presión de mercurio para luz UV-C (Gayán et al., 2014). El resultado del calentamiento de la lámpara se refleja en un incremento de la temperatura de la muestra a medida que se aplican PL. Sin embargo, este incremento (desde los 19,0 hasta los 26,8°C) no fue lo suficientemente elevado como para provocar la inactivación térmica en las especies estudiadas. Estos resultados indicarían que el flujo luminoso producido por la lámpara no correspondía totalmente a la longitud de onda responsable de la inactivación (254 nm), sino que una parte se disiparía por la producción de energía en forma de calor.

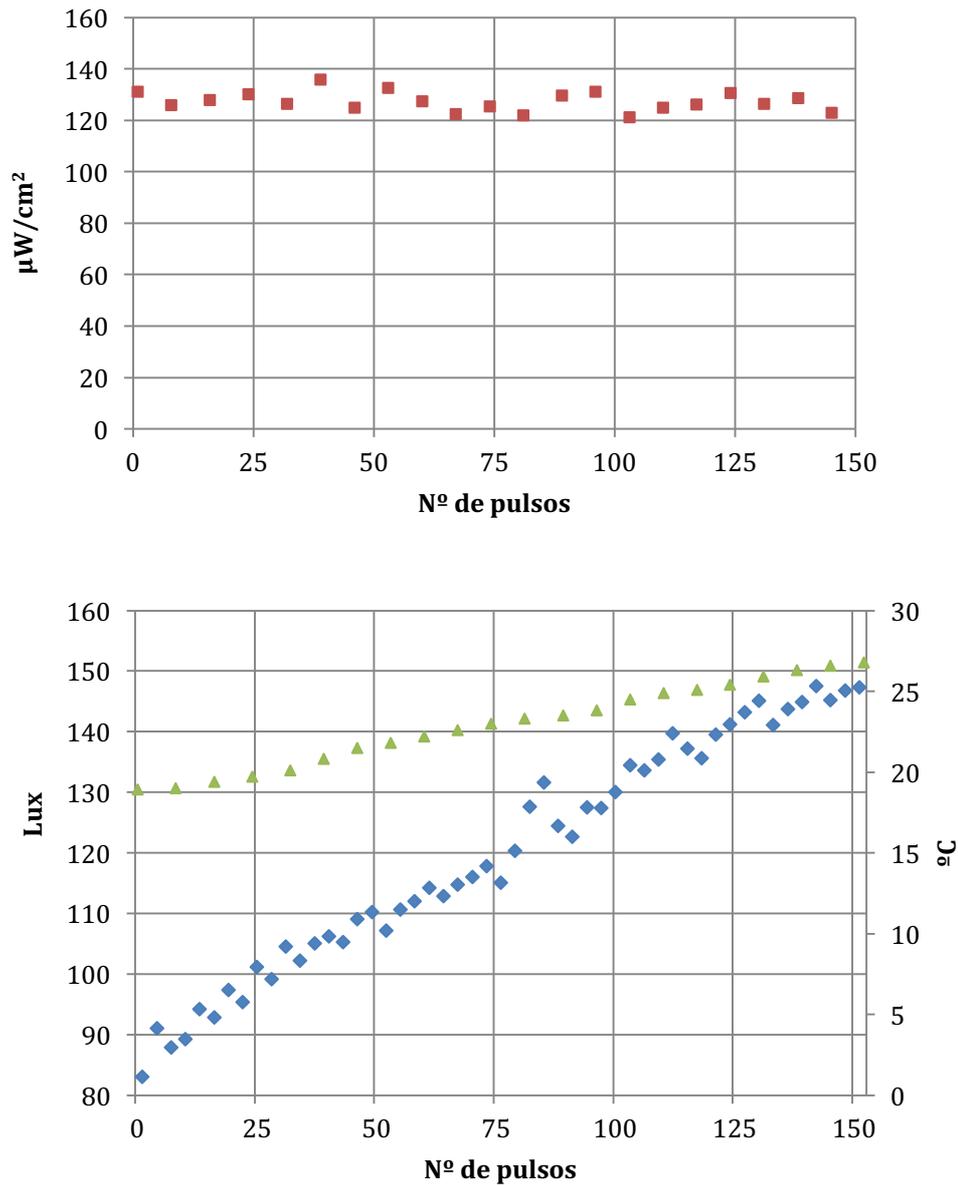


Figura 4.3.2.2. Medida de parámetros de (■) fluencia ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$), (◆) iluminancia (Lux), y (▲) temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

4.4 Recuento de supervivientes y construcción de curvas de supervivencia

Una vez realizado el tratamiento con pulsos de luz, se vertían unos 20 mL de agar líquido en las placas. Las placas se agitaban y se llevaban a incubar en las condiciones anteriormente descritas (Tabla 4.2.1). Transcurrido el tiempo necesario, se procedió al recuento de las colonias supervivientes al tratamiento mediante el uso de un contador automático de colonias. La construcción de las curvas de supervivencia se realizó por medio del software Microsoft Office Excel 2007, representando la fracción de

supervivientes ($\text{Log } N_t/N_0$) frente al tiempo de tratamiento expresado como número de pulsos.

Cada experimento de esta investigación se realizó por duplicado. Se estableció un límite de detección de recuento, con el uso del contador automático, de 10 colonias por placa. Cuando el número de colonias fue inferior a este número, se optó por representar el punto correspondiente mediante una línea discontinua.

4.5 Análisis estadístico

Con el fin de determinar diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los resultados, se realizaron análisis de *t*-Student y ANOVA utilizando el programa GraphPad PRISM 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Las barras de error de las figuras corresponden a la desviación estándar.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez que se caracterizó la instalación de PL, se procedió a evaluar la eficacia letal de los mismos y determinar la influencia de distintos parámetros utilizando las mismas condiciones experimentales, lo que permite comparar directamente los resultados.

5.1 Efecto del tipo de microorganismo en la eficacia letal de la luz pulsada

En la figura 5.1.1, se representan las curvas de supervivencia frente a la luz pulsada (0, 10, 20, 50, 100 y 200 pulsos) obtenidas con los distintos microorganismos investigados (*E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, y esporos de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*) a un pH de 7,0.

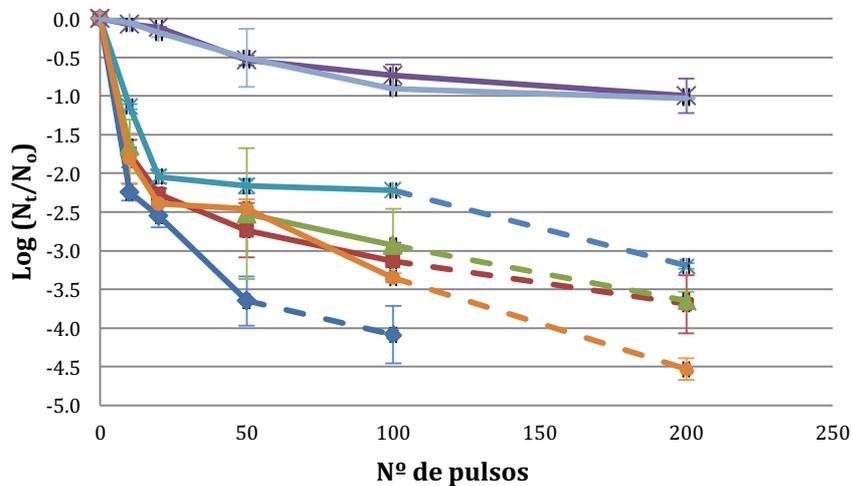


Figura 5.1.1. Inactivación de diferentes especies microbianas a pH 7,0. (◆) *E. coli*, (■) *S. typhimurium*, (▲) *L. monocytogenes*, (●) *S. cerevisiae*, (◆) *S. aureus*, (✱) *B. subtilis*, (⊕) *B. stearothermophilus*.

El tratamiento tuvo efecto en todas las especies estudiadas. De esta manera, se pudo lograr el que era el principal objetivo de este estudio: la puesta a punto y funcionamiento de una instalación que permita poder realizar tratamientos por pulsos de luz, consiguiéndose inactivar microorganismos con un equipo cuyo coste es significativamente inferior al de otras instalaciones comerciales para este tipo de tratamiento.

Se pudo observar que existía una relación entre el nivel de inactivación microbiana y la duración del tratamiento, de manera que mediante un tratamiento más intenso (mayor número de pulsos) se producía una reducción mayor del número de

microorganismos. Este hecho ocurrió en todos los microorganismos investigados, con mayor o menor efecto dependiendo de la especie considerada.

No obstante, en algunos casos se observó la aparición de una fase de cola al final de la curva, de manera que tras tiempos de tratamiento más prolongados la velocidad de inactivación disminuía. Algunos estudios muestran curvas de inactivación en la que la velocidad de inactivación se ve ralentizada con el aumento del tiempo de tratamiento o la intensidad aplicada (Uesugi et al., 2007; Izquier & Gómez-López, 2011). Una vez alcanzada esta fase, no tendría utilidad práctica incrementar el tratamiento, ya que no se obtendría una inactivación adicional significativa, y sólo supondría un incremento de los costes, del tiempo de tratamiento, e incluso el deterioro del producto como consecuencia de un procesado intenso. En el caso de los tratamientos mediante luz pulsada, la aparición de esta cola se ha asociado al tratamiento inefectivo de parte de las células debido a un efecto sombra (McDonald et al., 2000a; Sauer & Moraru, 2009), y/o a la existencia de una fracción de la población con mayor resistencia al tratamiento (Uesugi et al., 2007).

En general, se asume que la sensibilidad de las bacterias frente a la luz pulsada depende del tipo de envoltura que presentan, siendo las bacterias Gram positivas más resistentes que las Gram negativas (MacGregor et al., 1998; Rowan et al., 1999). Esta variación en la sensibilidad de la luz podría ser debido a las diferencias estructurales de la pared celular, ya que en los organismos Gram positivos la pared celular tiene una capa de peptidoglicano más gruesa (20-80 nm) que en los organismos Gram negativos (1-2 nm) (Alcamo, 1997).

La Figura 5.1.2 muestra los ciclos de inactivación conseguidos en cada microorganismo tras la aplicación de un tratamiento de 50 pulsos, a efectos comparativos.

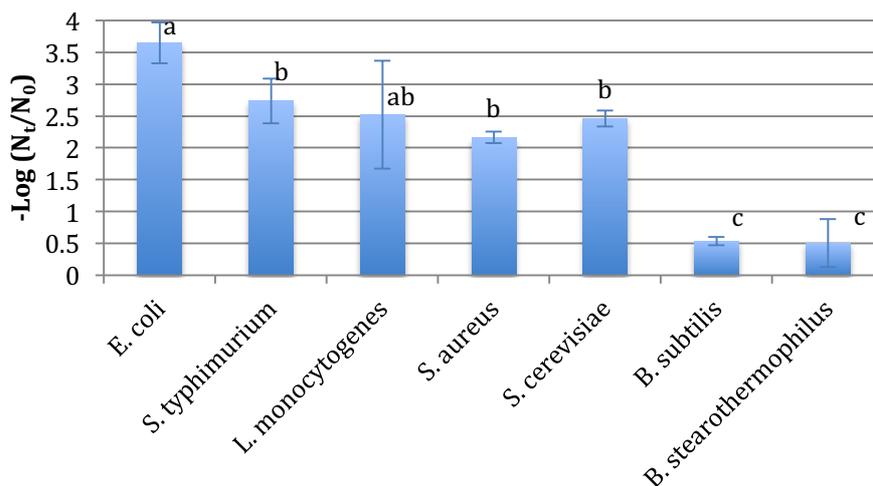


Figura 5.1.2. Ciclos de inactivación obtenidos tras un tratamiento de 50 pulsos. Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

De manera general, se pudo observar que no existían grandes diferencias entre la sensibilidad a los pulsos de luz de las formas vegetativas de levaduras y bacterias, aspecto que contrasta con otras tecnologías como es el caso de los tratamientos térmicos.

Se observó que *E. coli* presentó un nivel de inactivación notablemente alto, de modo que tras 50 pulsos de luz se lograban 3,5 ciclos de inactivación. Este nivel de inactivación se elevó a 4 ciclos al aumentar la intensidad a 100 pulsos de luz (figura 5.1.1.). En comparación con el resto de microorganismos, se observó que esta bacteria necesitaría un tratamiento de una intensidad inferior para obtener una eficacia letal similar.

En relación a *S. typhimurium*, se constató una reducción de aproximadamente 2,5 ciclos logarítmicos tras el tratamiento con 50 pulsos. De la misma forma que con el resto de especies ensayadas, existió una clara correlación entre la intensidad del tratamiento y la reducción en el número de células viables. La curva que relaciona la intensidad de tratamiento con la reducción logarítmica para *S. typhimurium* fue muy similar para *L. monocytogenes*, así como el nivel de reducción alcanzado tras un tratamiento de 50 pulsos. Finalmente, *S. aureus* fue la célula vegetativa bacteriana con mayor resistencia a los PL alcanzándose una inactivación 2 ciclos logarítmicos y observándose una marcada cola (figura 5.1.1.).

La levadura *S. cerevisiae* mostró un alto nivel de inactivación con no muy altas dosis de pulsos. Mediante un tratamiento de 50 pulsos se logró una reducción logarítmica de 2,5 ciclos.

El nivel más bajo de inactivación se observó en las dos especies del género *Bacillus*, *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*. Con un tratamiento de 50 pulsos, se logró una reducción de alrededor de 0,5 ciclos logarítmicos. Realizando un tratamiento más intenso, de 200 pulsos, se consiguió la reducción de una unidad logarítmica. Este resultado contrasta con los obtenidos por otros autores en otros géneros, como en *B. cereus*, donde se obtuvieron reducciones logarítmicas de 3 ciclos tras 100 pulsos y 5 ciclos tras 200 pulsos de luz (Rowan et al., 1999). Estas diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a las diferentes matrices de tratamiento utilizadas y/o diferentes intensidades aplicadas. En cualquier caso, es importante destacar que esta tecnología es capaz de inactivar esporos bacterianos, aunque en menor grado que las células vegetativas, como era esperable. Además, de nuestros resultados se desprende que el nivel de resistencia al calor de los mismos no influye en su resistencia a los pulsos de luz, ya que los esporos de *B. stearothermophilus*, que se caracterizan por su elevada resistencia al calor, mostraron un sensibilidad a los pulsos de luz similar a los de *B. subtilis*, cuya resistencia al calor es mucho menor.

Dados los resultados obtenidos, consideramos que sería interesante conocer cómo afecta la variación de los parámetros en el efecto de los pulsos sobre los microorganismos.

5.2 Efecto del pH del medio en la eficacia de inactivación de la luz pulsada

El pH del medio de tratamiento es considerado como uno de los factores que afecta a la resistencia microbiana frente a distintas tecnologías en mayor magnitud. Por ejemplo, la acidificación es un técnica muy utilizada en la industria conservera para lograr reducir la termorresistencia de las especies esporuladas, consiguiendo así reducir la intensidad de los tratamientos térmicos a aplicar. En la figura 5.2.1 se puede observar la eficacia de la inactivación de los distintos tratamientos de luz pulsada para cada microorganismo, dependiendo del pH del medio de tratamiento (pH 4,0 y 7,0).

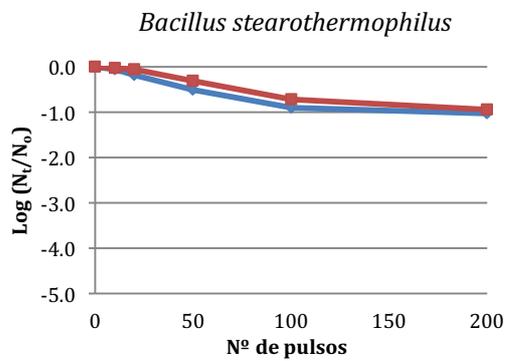
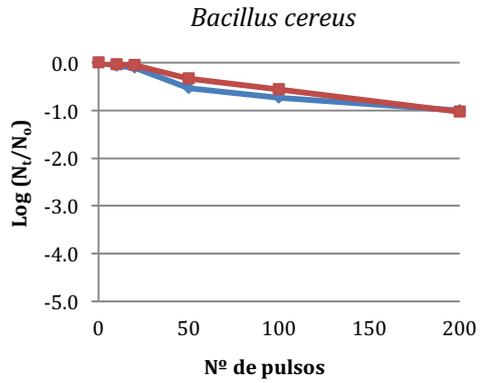
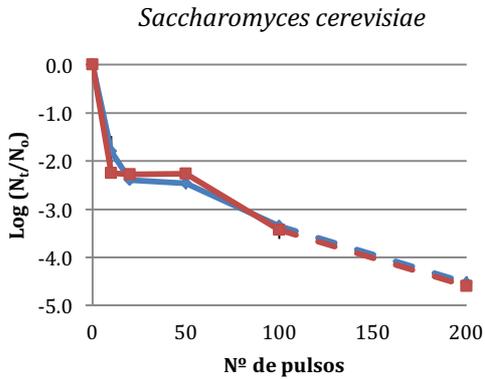
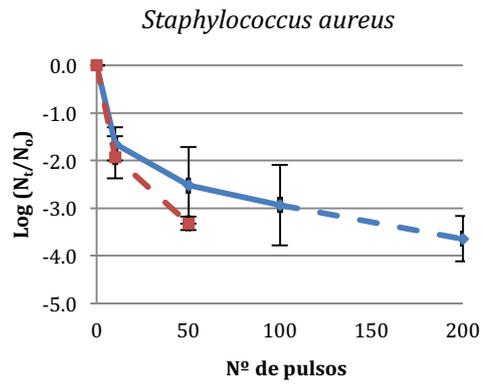
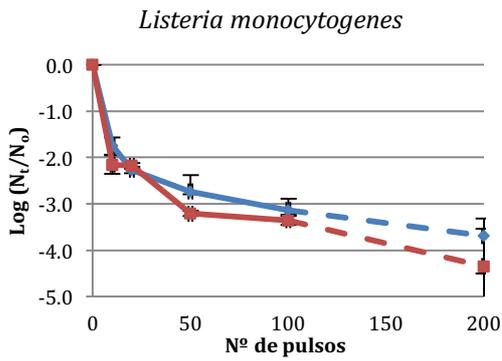
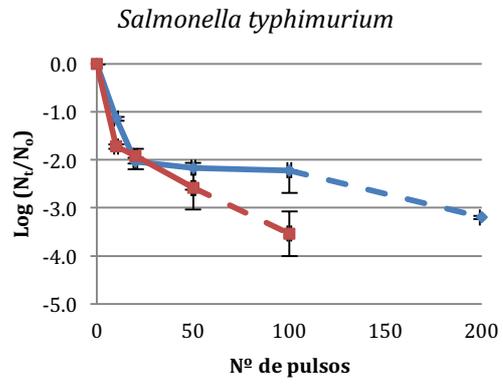
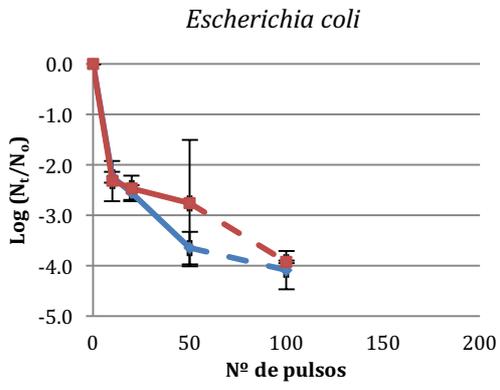


Figura 5.2.1. Inactivación microbiana alcanzada tras el tratamiento a diferente pH. (□) pH 7, (■) pH 4.

No es fácil extraer una conclusión general del efecto del pH del medio sobre la eficacia del tratamiento, ya que cada microorganismo mostró un comportamiento ligeramente diferente frente al tratamiento dependiendo del pH. En cualquier caso, sí se puede confirmar que el tratamiento fue eficaz en ambos casos.

En el caso de *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* y las dos especies esporuladas, el pH del medio de tratamiento apenas afectó a la eficacia letal y las curvas de supervivencia obtenidas prácticamente se superpusieron.

E. coli fue el único microorganismo en el que se observó un nivel de inactivación algo mayor a pH 7,0 que a pH 4,0. Aunque también cabe destacar que en el tratamiento con 100 pulsos de luz, el nivel de reducción logarítmica fue prácticamente idéntico a los dos pHs.

Por otro lado, se observó que el tratamiento afectó de manera más intensa a *S. typhimurium* y *S. aureus* cuando fue aplicado a pH 4,0 que cuando se realizó a pH neutro. Esta diferencia resultó más patente cuando se observaban los resultados derivados de los tratamientos más prolongados.

En la Figura 5.2.2, se ha representado la eficacia letal de los diferentes tratamientos (con 0, 10, 20, 50, 100 y 200 pulsos) que se realizaron sobre los distintos microorganismos investigados (*E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*) a un pH 4,0.

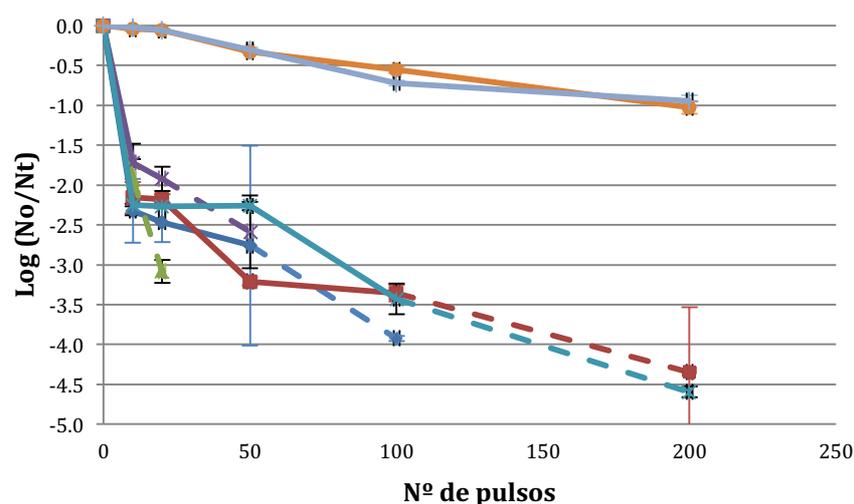


Figura 5.2.2. Inactivación microbiana alcanzada tras el tratamiento en diferentes géneros microbianos a pH 4. (◆) *E. coli*, (■) *S. typhimurium*, (▲) *L. monocytogenes*, (✕) *S. aureus*, (✱) *S. cerevisiae*, (●) *B. subtilis*, (◻), *B. stearothermophilus*.

De esta gráfica se desprende que quizás el uso de un pH ácido redujo las diferencias entre las distintas cepas de células vegetativas, debido a las pequeñas diferencias de comportamiento que presentaron determinadas especies como *S. aureus*. Sin embargo, es difícil poder afirmar que exista un efecto combinado del uso de luz pulsada y acidificación del medio. En vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el pH del medio de tratamiento apenas afecta a la inactivación por esta tecnología, en el abanico de especies utilizadas en este estudio. Este hecho puede suponer una ventaja, ya que permite un cálculo de los tratamientos a aplicar más preciso. En otro tipo de tecnologías, como el calor o las altas presiones, el pH del alimento a tratar sí que puede modificar notablemente la intensidad de tratamiento necesaria para lograr un mismo nivel de inactivación. Por el contrario, la casi ausencia de efecto del pH en la letalidad ha sido también descrita por Gayán (2013) en la inactivación de distintos microorganismos, pero aplicando luz UV-C. La poca influencia del pH en la letalidad de los PL podría deberse a que es la luz UV-C la principal responsable de la inactivación microbiana, más que otros posibles efectos.

5.3 Efecto del tratamiento mediante pulsos de luz en distintos productos alimentarios

En la figura 5.3.1 se representa la letalidad de los distintos tratamientos de PL sobre *E. coli* dependiendo del alimento en el cual se aplicó el tratamiento (caldo de cocido, caldo de verduras, zumo de naranja y leche entera).

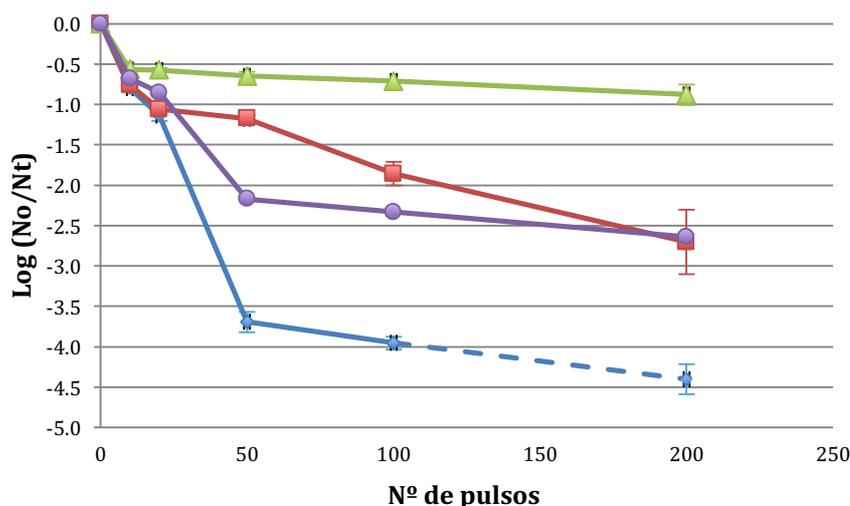


Figura 5.3.1. Inactivación microbiana de *E. coli* alcanzada tras el tratamiento con PL en diferentes productos alimentarios. (◆) caldo de cocido, (■) caldo de verduras, (▲) zumo de naranja, (●) leche entera.

Se pudo constatar que el tratamiento fue efectivo en mayor o menor medida en todos los productos alimentarios, alcanzándose como mínimo un nivel de inactivación de 1 ciclo logarítmico, aproximadamente, tras un tratamiento de 200 pulsos.

Se observó que *E. coli* presentó el nivel de inactivación más alto en el caldo de cocido en comparación con el mostrado en el resto de los productos alimentarios tratados. Como se puede observar, el tratamiento de 100 pulsos de luz provocó una reducción logarítmica de aproximadamente 4 ciclos en caldo de cocido. Estos resultados mostraron un alto poder de inactivación microbiana en un producto alimentario. La explicación acerca de la menor resistencia de *E. coli* en el caldo de cocido podría estar relacionada con el hecho de que este producto alimentario tiene un coeficiente de absorción bajo, por lo que el efecto del tratamiento sobre el microorganismo es mayor en este producto que en el resto, ya que la luz penetraría con mayor facilidad.

Tras un tratamiento de 100 pulsos de luz en el caldo de verduras, se consiguió un nivel de reducción logarítmica de casi 2 ciclos, siendo menor que el obtenido en el caldo de cocido. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en estudios realizados sobre la eficacia de la radiación UV en *E. coli* en los mismos productos alimentarios (Gayán et al., 2013). La razón por la que existe una diferencia entre ambos caldos podría explicarse por sus propiedades ópticas, ya que el coeficiente de absorción del caldo vegetal ($27,67 \text{ cm}^{-1}$) es mayor que el del caldo de cocido ($22,15 \text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, la turbidez del caldo vegetal (2315,4 NTU) es menor que la del caldo de cocido (3425,3 NTU), lo cual parece *a priori* contradictorio. El coeficiente de absorción es un parámetro útil para poder predecir la resistencia de *E. coli* a la radiación UV en medios de baja turbidez, por ejemplo en zumo de manzana, pero no tanto para medios con una turbidez alta (Koutchma et al., 2004). Los medios tratados con un alto contenido de sólidos suspendidos tienden a mostrar artificialmente un nivel de absorbancia mayor debido a la dispersión de la luz desde el detector (Linden & Darby, 1998), lo que conlleva una predicción poco precisa (Koutchma et al., 2004). En nuestro estudio se ha podido comprobar que se cumpliría esta premisa, ya que la diferencia de supervivencia de *E. coli* suspendida en ambos caldos tras 200 pulsos aplicados es de casi 2 unidades logarítmicas superior en el caldo vegetal, pese a su menor turbidez. También es posible que, de los dos parámetros ópticos, el coeficiente de absorción tenga una mayor relevancia que la turbidez en cuanto al posible efecto pantalla ejercido por los componentes del alimento. En cualquier caso, también podría

ser posible que en el caldo de cocido contenga algún compuesto que limitase la recuperación de células dañadas por el tratamiento de PL, incrementando de este modo la eficacia letal del tratamiento. Este es un aspecto de interés que requeriría una mayor investigación.

En el caso de la leche entera, el nivel de inactivación observado fue menor que en el caldo de cocido (casi 1,5 ciclos logarítmicos menor tras 100 pulsos) y parecido al del caldo de verduras. Es necesario destacar que otros autores han demostrado que la leche, al ser un producto opaco, carece de las características idóneas para que el tratamiento mediante pulsos de luz tenga éxito (Palgan et al., 2010), hecho que se contrapone a lo demostrado en el presente estudio. La leche tiene el coeficiente de absorción más alto de los productos alimentarios tratados ($247,9 \text{ cm}^{-1}$), así como la turbidez más alta (37.300 NTU) por lo que la resistencia de *E. coli* al tratamiento mediante luz pulsada debería ser mayor. Esto podría indicar que, de forma similar al caldo de cocido, existan compuestos en la leche, en este caso factores antimicrobianos, que potenciasen la eficacia letal del tratamiento por PL. También, y debido a su mayor valor de potencial redox, los PL podrían favorecer reacciones de oxidación incrementando la inactivación microbiana como ya se ha descrito en los tratamientos por luz UV-C (Koutchma y col., 2009).

Por otra parte, en la leche, se observó un estancamiento en el efecto letal del tratamiento aplicado una vez que este sobrepasó los 50 pulsos. Como se puede apreciar en la Figura 5.3.1, se consiguió una reducción de más de 2 ciclos logarítmicos con 50 pulsos de luz, hecho que contrasta con una reducción de poco más de 2,5 ciclos logarítmicos que se produjo tras un tratamiento de 200 pulsos de luz (el más intenso de todo el estudio). Esta cinética es similar a la que se observa para el caldo de cocido o el zumo de naranja, pero a distintos niveles y tiempos de inactivación. Como ya se ha comentado, sería interesante investigar con más detalle el mecanismo de acción de los PL con el fin de determinar la aparición de los fenómenos de “cola” observados en estos alimentos. Además, sería necesario evaluar la letalidad de los tratamientos en flujo continuo para evitar que la posible disminución del efecto de los PL sea debida a un problema de uniformidad en la aplicación del tratamiento a todo el volumen del producto, como se ha demostrado en otros sistemas basados en la aplicación de fotones para inactivar microorganismos (Gayán, 2013).

El zumo de naranja fue el medio que más protegió a *E. coli* frente a la inactivación. Tras un tratamiento de 200 pulsos de luz, solamente se logró una reducción logarítmica en la población. Este hecho podría estar relacionado con las características ópticas del producto. El zumo de naranja tiene un coeficiente de absorción elevado ($81,65 \text{ cm}^{-1}$), lo que sumado a su alta turbidez (4195 NTU) podría afectar a la capacidad de penetración de la luz, y en consecuencia, a los niveles de inactivación microbiana sobre el producto a tratar (Palgan et al., 2010). Además, en la curva de inactivación obtenida en este producto alimentario se observaba un fenómeno de cola, que podría estar relacionado también con la escasa penetración de la luz en este medio, debida a un efecto sombra causado por el alto contenido en sólidos suspendidos. Esta explicación coincide con la detallada por otros autores, como Pataro et al. (2011), en este tipo de producto alimentario.

El orden de sensibilidad observado en los cuatro alimentos no estaría justificado ni por el pH ni por el potencial redox de los mismos (Tabla 4.1.1). Estos resultados confirman que la inactivación microbiana por pulsos de luz no depende del pH del medio de tratamiento y sugieren que otros factores son más importantes en esta tecnología. A este respecto, de nuestros resultados se desprende que los factores de naturaleza física (parámetros ópticos) podrían ser importantes, dado que, la resistencia de *E. coli* en los caldos y zumo aumentó conforme aumentaba el coeficiente de absorción del medio. No obstante, este parámetro no justificaría totalmente la diferencia en resistencia observada para *E. coli* en los cuatro alimentos utilizados, ya que en la leche se obtuvo una inactivación superior a la esperable. No se puede descartar por tanto que existan otros aspectos de la composición del alimento, que pudieran ser importantes, por ejemplo, la presencia de sustancias antimicrobianas que pudieran actuar de manera sinérgica con los pulsos de luz.

Estos resultados permiten obtener una base sobre la que desarrollar pruebas adicionales con el objetivo de conocer mejor la efectividad de un equipo como el utilizado para este estudio. Según los resultados obtenidos, se puede afirmar que la instalación desarrollada ha logrado provocar niveles de inactivación significativos sobre *E. coli* suspendido en diferentes productos alimentarios líquidos. No obstante, es necesario continuar realizando ensayos para poder ajustar mejor los parámetros y conseguir comprender mejor la influencia de las condiciones de tratamiento en el resultado final con el objetivo de poder realizar tratamientos eficientes sobre

productos alimentarios que provoquen niveles de inactivación aceptables para la seguridad alimentaria.

6 CONCLUSIONES

Analizando el conjunto de resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

- Es posible desarrollar una instalación para poder tratar muestras de alimentos con pulsos de luz sin que ello conlleve un coste elevado.
- El tratamiento por pulsos de luz aplicado en la instalación desarrollada es capaz de reducir la población de todas las especies microbianas estudiadas, tanto células vegetativas como esporos, lo que permitiría desarrollar tratamientos de pasteurización y esterilización.
- El nivel de inactivación obtenido mediante el uso de pulsos de luz depende del tipo de microorganismo tratado.
- El pH del medio de tratamiento no influye de manera significativa en el efecto que tiene el tratamiento mediante pulsos de luz sobre los géneros microbianos estudiados.
- El tratamiento de pulsos de luz aplicado en la instalación desarrollada es capaz de inactivar *E. coli* en caldo de cocido, caldo de verduras, zumo de naranja y leche entera. Las características de estos productos hacen que la efectividad del tratamiento varíe, de manera que resulta más eficaz en el caldo de cocido, y menos en el zumo de naranja.

En general, la aplicación de un tratamiento mediante pulsos de luz con el equipo desarrollado es capaz de ofrecer una alternativa a otras instalaciones basadas en la misma técnica y que tienen un coste mucho mayor, para llevar a cabo estudios básicos de laboratorio. No obstante, serían necesarios estudios adicionales con el fin de conocer más, no sólo acerca del efecto del equipo, sino también sobre el uso de la técnica de pulsos de luz como método de conservación de alimentos.

CONCLUSIONS

The analysis of the results of the study provided the following conclusions:

- It is possible to develop a low cost device to treat food samples with pulsed light.

- The device is able to inactivate all the investigated microbial species including vegetative cells and spores. This opens the possibility of designing pasteurization and sterilization treatments for liquid foods.
- The amount of inactivation achieved by PL depends on the type of microorganism.
- The pH of the treatment media has not a significant impact on the effect of the treatment by PL, on the studied microorganisms.
- The device can reduce the load of microorganisms in meat and vegetable broth, orange juice and whole milk. The physico-chemical characteristics of these substrates alter the effectivity of the treatment, in such a way that it is more effective in meat broth, and less effective in orange juice.

In general terms, the treatment with pulsed light with the low cost device is an effective alternative to other protocols based on the same methodology and with a higher cost of installation, for basic laboratory studies. However, it is necessary to carry out additional investigations to finely tune the device, and to obtain further data about the use of PL as an effective method for food preservation.

7 APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

La elaboración del trabajo fin de grado me ha permitido ampliar mis conocimientos de forma teórica y práctica.

En cuanto a la formación teórica, he ampliado mis conocimientos acerca de las técnicas emergentes de conservación de alimentos, y más concretamente, de la tecnología basada a la aplicación de pulsos de luz. A lo largo de la realización de este trabajo, he podido conocer y estudiar el funcionamiento de este tipo de estrategia de conservación, así como su fundamento y el efecto que produce en los microorganismos.

Aunque en general las aportaciones de esta asignatura han sido prácticas, tanto ampliando conocimientos previos como la forma correcta de trabajar en un laboratorio, trabajar en equipo, elaborar medios de cultivo, siembra y recuento de placas, manejo del equipo de luz pulsada, la interpretación de los resultados o la búsqueda de bibliografía. He adquirido nuevos conocimientos, especialmente el trabajo de forma autónoma, su organización y planificación, la resolución de problemas con autonomía, la obtención de conclusiones de los resultados analizándolos en su conjunto, y por último la elaboración de un informe científico utilizando el español y el inglés en algunos apartados.

En conclusión, en esta asignatura he podido aplicar los conocimientos adquiridos previamente en otras asignaturas para realizar un estudio experimental trabajando en el laboratorio realizando correctamente el tratamiento de pulsos de luz, llevando a cabo recuentos microbianos, una fase de recopilación de resultados e interpretación, y, por último la elaboración del informe final.

8 BIBLIOGRAFÍA

Alcamo, I. E. (1997). *Fundamentals Of Microbiology*. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. and a Imprint of Addison Wesley Longmann Inc.

Artíguez, M. L. (2013). *Aplicación de luz pulsada para la inactivación de microorganismos*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.

Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., & Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 66(4), 542-548.

Bintsis, T., Litopoulou - Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(6), 637-645.

DeSimone, N. A., Christiansen, C., & Dore, D. (1999). Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Physical Therapy*, 79(9), 839-846.

Dunn, J., Bushnell, A., Ott, T., & Clark, W. (1997). Pulsed white light food processing. *Cereal Foods World*, 42(7), 510-515.

Dunn, J. E., Clark, R. W., Asmus, J. F., Pearlman, J. S., Boyer, K., Painchaud, F., & Hofmann, G. A. (1989). U.S. Patent No. 4,871,559. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Dunn, J., Ott, T., & Clark, W. (1995). Pulsed-light treatment of food and packaging. *Food Technology*, 49(9), 95-98

Farrel, H., Hayes, J., Laffey, J., & Rowan, N. (2011). Studies on the inactivation between pulsed UV light irradiation and the simultaneous occurrence of molecular and cellular damage in clinically-relevant *Candida albicans*. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 317-326.

Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1), 9-27.

- Gayán, E. (2013). Desarrollo de procesos combinados de higienización de alimentos basados en la aplicación de radiación UV y calor. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Gayán, E., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Continuous-Flow UV Liquid Food Pasteurization: Engineering Aspects. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2813-2827.
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005). Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 460-470.
- Gómez-López, V.M., Ragaert, P., Debevere, J., & Delieguere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(9), 464-473
- Izquier A., & Gómez-López, V. M. (2011). Modelling the pulsed light inactivation of microorganisms naturally occurring on vegetable substrates. *Food Microbiology*, 28(6), 1170-1174.
- Jeantet, R., Baron, F., Nau, F., Roignant, M., & Brule, G. (1999). High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1381-1386
- Jenkins, J.B. (1985). Replicación del material genético. *Genética*, Barcelona Ed. Reverté, 305-308
- Koseki, S., Yoshida, K., Isobe, S., & Itoh, K. (2004). Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial decontamination of cucumbers and strawberries. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1247-1251
- Koutchma, T., Forney, L.J., & Moraru, C.L. (2009). *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Application*. CRC Press, Boca Raton, New York.
- Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., Parisi, B. (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminaand turbulent flow reactors. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 179-189.
- Kuo, F., Ricke, S.C., & Carey, J.B. (1997). Shell egg sanitation: UV radiation and egg rotation to effectively reduce population of aerobes, yeasts, and molds. *Journal of Food Protection*, 60(6), 694-697.

- Linden K. G., & Darby, J. L. (1998). Ultraviolet disinfection of marginal effluents: determining ultraviolet absorbance and subsequent estimation of ultraviolet intensity. *Water Environment Research*, 70(2), 214-223.
- MacGregor, S.J., Rowan, N.J., McIlvaney, L., Anderson, J.G., Fouracre, R.A., & Farish, O. (1998). Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Letters in Applied Microbiology*, 27(2), 67-70.
- Matak, K. E., Churey, J. J., Worobo, R. W., Summer, S. S., Hoving, E., Hackey, C. R., & Pierson, M. D. (2005). Efficacy of UV Light for the reduction of *Listeria monocytogenes* in Goat's milk. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2212-2216.
- McDonald, K. F., Curry, R. D., Clevenger, T.E., Brazos, B. J., Unklesbay, C. R., Eisenstark, A., Baker, S., Golden, J., & Morgan, R. (2000). The development of photosensitized pulsed and continuous ultraviolet decontamination techniques for surfaces and solutions. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28(1), 89-96.
- Morata-Barrado, A. (2008). *Nuevas tecnologías de conservación de alimentos*. AMV Ediciones. Madrid.
- Miller, B. M., Sauer, A., & Moraru, C. I. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* in milk and concentrated milk using pulsed-light treatment. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5597-5603
- Palgan I., Camini, I. M., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A., & Lyng, J. G. (2010) Effectiveness of High Intensity Light Pulses (HILP) treatments for the control of *Listeria innocua* in Apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiology* 28(1), 14-20.
- Park, H. Hung, Y.C., & Kim, C. (2002). Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1276-1280.
- Pataro, G., Muñoz, A., Palgan, I., Noci, F., Ferrari G., & Lyng, J. G. (2011). Bacterial inactivation in fruit juices using a continuous flow Pulsed Light (PL) system. *Food Research International*, 44(6), 1642-1648.
- Pereira, R.N., & Vicente, A.A. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7), 1936-1943.

- Raso, J., Pagan, R., Condón, S., & Sala, F.J. (1998). Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 465-471.
- Roberts, P., & Hope, A. (2003). Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulse dlight. *Journal of Virological Methods*, 110(1), 61-65.
- Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G. Fouracre, R.A., McIlvaney, L., & Fairsh, O. (1999). Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1312-1315.
- Sauer, A., & Moraru C. I. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in Apple juice and Apple cider, using pused light treatment. *Journal of Food Protection* 72(5), 937-944.
- Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K., & Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), 151-158.
- Uesugi, A. R., Woodling, S. E., & Moraru C. I. (2007). Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of Food Protection* 70, 2518-2525.
- Van der Veen, M. E., Van Der Goot, A. J., Vriezinga, C. A., De Meester, J. W. G., & Boom, R. M. (2004). On the potential of uneven heating in heterogeneous food media with dielectric heating. *Journal of Food Engineering*, 63(4), 403-412.
- Wekhof, A. (2000). Disinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54(3), 264-276.