

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***Evaluación del efecto de la luz UV-C y del antimicrobiano natural vainillina sobre la calidad microbiológica de bebidas proteicas***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Alimentos, mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos por:**

***Cecilia Andrea Hernando Avendaño***

**Directora de Tesis: Dra. Cielo Char Aubry**

**Santiago-CHILE**

**Abril-2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato**

**Cecilia Andrea Hernando Avendaño**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Alimentos, mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos en el examen público rendido el día**

---

**Director de Tesis:**

**Dra. Cielo Char**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Luis Puente**

---

**Dr. Paulo Díaz-Calderón**

---

**Lic. José Romero**

---

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Profesora Cielo Char por recibirme tan afectuosamente en el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química y entregarme sus valiosos conocimientos de Microbiología para desarrollar mi tesis de Magíster a pesar de no haber trabajado antes en el área. Valoro todo el tiempo que me dedicó y excelente disposición cuando mis horarios eran difíciles, pudiendo avanzar en nuestros ensayos cuando los resultados parecían complicados. Aunque incluso atravesamos una pandemia, su apoyo permanente permitió que sacáramos adelante la tesis ofreciéndome infinitas oportunidades para seguir aprendiendo. También agradecer a Helem Eisele que me ayudó muchísimo en la última parte de mis experimentos, tu colaboración fue enorme para poder terminar este estudio y valoro tu actitud positiva que siempre mantenías en el laboratorio. Agradezco a Francisco Sepúlveda, mi compañero de laboratorio, por la entrega afectuosa de sus conocimientos, las enseñanzas proporcionadas y todas las conversaciones mientras hacíamos los ensayos. A Sebastián Pozas, vecino de laboratorio, que siempre nos ayudó cuando necesitamos un equipo o reactivo, fuiste un gran compañero de departamento. También a Fernando Lara que me socorrió cuando el equipo UV fallaba o simplemente necesitábamos agua destilada, tu ayuda fue vital para el desarrollo de esta tesis. Quisiera agradecer también a la comisión de la Tesis compuesta por los profesores José Romero, Luis Puente y Paulo Díaz-Calderón por sus correcciones, consejos e inquietudes que sirvieron para enriquecer la tesis. A la profesora María Angélica Larraín por prestarme el equipo espectrocolorímetro y enseñar a usarlo, y al profesor Cristián Tapia por facilitarme el uso del viscosímetro.

También quiero agradecer a mis padres Cecilia y César quienes me han apoyado incondicionalmente y motivado a seguir aprendiendo y encontrando mi vocación. A mi hermana Paula, que me ha dado el soporte y las palabras necesarias para continuar mis diferentes proyectos. Y principalmente agradezco a Jorge y Matilda, por ser mis grandes compañeros en el día a día. Me has ayudado infinitamente durante todo este largo viaje, con pequeñas y grandes acciones que me permitieron avanzar en este nuevo inicio de mi carrera. Espero que sigamos construyendo en conjunto un camino fructífero para nuestra familia.

## FINANCIAMIENTO

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Cielo Char Aubry.

El trabajo de investigación fue financiado por Beca ANID Magíster Nacional 2020, Folio 22200217.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Hernando, C., Char, C. Efecto de la luz UV-C y del antimicrobiano natural vainillina sobre la inactivación de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* en bebidas proteicas. XXIII Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología en Alimentos. Santiago, Chile, 20 al 22 de octubre de 2021.

Char, C., Sepúlveda, F., and Hernando, C. 2022. Natural antimicrobials for extending the shelf life of foods. International Chemistry Conference, CHEMEET. 27 al 29 de Junio de 2022. On-line oral exposition.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	III
FINANCIAMIENTO .....	IV
ÍNDICE GENERAL .....	1
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	3
ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.2. Inocuidad de los alimentos .....	12
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
1.3. Deterioro de jugos y productos lácteos.....	13
1.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
1.4. Tratamientos térmicos para la preservación de alimentos .....	14
1.5. Tratamientos emergentes para inocuidad alimentaria .....	15
1.5.1. Luz ultravioleta .....	15
1.5.2. Factores que afectan el procesamiento UV .....	17
1.5.3. Equipos de luz UV-C.....	17
1.5.4. Mecanismo de inactivación microbiana por luz UV-C.....	18
1.5.5. Inactivación microbiana en alimentos mediante luz UV.....	19
1.6. Antimicrobianos naturales .....	21
1.6.2. Inactivación microbiana en alimentos adicionados con vainillina .....	22
1.7. Tecnología de obstáculos.....	24
2. HIPÓTESIS .....	26
3. OBJETIVO GENERAL.....	26
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Reactivos.....	27
5.2. Cepas bacterianas .....	27
5.3. Preparación de bebidas.....	27
5.4. Propiedades físicas y químicas de las bebidas.....	28
5.5. Preparación de inóculos .....	29

5.6.	Tratamientos UV-C.....	29
5.6.1.	Fuente de luz UV-C .....	29
5.6.2.	Cálculo de las dosis germicidas UV-C .....	31
5.7.	Tratamiento combinado de vainillina y UV-C .....	32
5.8.	Enumeración bacteriana .....	32
5.9.	Modelo de distribución de resistencias de Weibull .....	32
5.10.	Análisis estadístico .....	33
6.	RESULTADOS .....	34
6.1.	Caracterización fisicoquímica de las bebidas proteicas.....	34
6.2.	Determinación de la dosis germicida UV-C .....	36
6.3.	Efecto de luz UV-C en la inactivación de <i>E. coli</i> en las bebidas proteicas.....	36
6.4.	Efecto de luz UV-C en la inactivación de <i>L. innocua</i> en las bebidas proteicas 37	
6.5.	Efecto combinado de luz UV-C y vainillina en la inactivación de <i>E. coli</i> en las bebidas proteicas.....	38
6.6.	Efecto combinado de luz UV-C y vainillina en la inactivación de <i>L. innocua</i> en las bebidas proteicas .....	39
6.7.	Aplicación del modelo de Weibull a las curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> en las bebidas proteicas .....	40
6.8.	Análisis de Weibull de la inactivación de <i>L. innocua</i> en las bebidas proteicas 45	
7.	DISCUSIÓN .....	50
7.1.	Formulación de bebida proteica .....	50
7.2.	Efecto de la luz UV-C en las propiedades fisicoquímicas de alimentos líquidos .....	52
7.3.	Efecto de la luz UV-C y antimicrobianos en la inactivación microbiana.....	54
7.4.	Resistencia UV-C de microorganismos .....	56
7.5.	Cinética de inactivación por luz UV-C .....	58
8.	CONCLUSIONES .....	60
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

**Tabla 1.** Formulaciones de bebidas proteicas.

**Tabla 2.** Caracterización fisicoquímica de bebidas proteicas.

**Tabla 3.** Cálculo de dosis UV-C aplicadas en relación al tiempo de procesamiento.

**Tabla 4.** Parámetros de distribución tipo Weibull ( $b$  y  $n$ ) y estadísticas relacionadas correspondientes a la supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas tratadas con luz UV-C con o sin vainillina (0,1% p/v).

**Tabla 5.** Parámetros de distribución tipo Weibull ( $b$  y  $n$ ) y estadísticas relacionadas correspondientes a la supervivencia de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con luz UV-C con o sin vainillina (0,1% p/v).

### FIGURAS

**Figura 1.** Montaje de equipo UV-C de flujo continuo.

**Figura 2.** Inactivación de *E. coli* por luz UV-C en bebidas proteicas.

**Figura 3.** Inactivación de *L. innocua* por luz UV-C en bebidas proteicas.

**Figura 4.** Inactivación de *E. coli* por luz UV-C y vainillina en bebidas proteicas.

**Figura 5.** Inactivación de *L. innocua* por luz UV-C y vainillina en bebidas proteicas.

**Figura 6.** Ajuste del modelo de Weibull a los datos de supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina.

**Figura 7.** Distribución de frecuencias de resistencias correspondientes a las curvas de supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina ajustadas con la función de distribución acumulativa de Weibull.

**Figura 8.** Ajuste del modelo de Weibull a los datos de supervivencia de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina.

**Figura 9.** Distribución de frecuencias de resistencias correspondientes a las curvas de supervivencia de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina ajustadas con la función de distribución acumulativa de Weibull.

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -lactoalbúmina

$\beta$ -LG:  $\beta$ -lactoglobulina

CPD: ciclobutano pirimidina

*E. coli*: *Escherichia coli*

GRAS: generalmente reconocido como seguro

*L. innocua*: *Listeria innocua*

*L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*

LF: lactoferrina

MCC: concentrado de caseína micelar

MIC: concentración inhibitoria mínima

MPC: concentrado de proteína de leche

p/p: peso/peso

p/v: peso/volumen

RTD: listas para beber

*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*

SUH: síndrome urémico hemolítico

UFC: unidades formadoras de colonias

UV: ultravioleta

WPC: concentrado de proteína de suero

WPI: aislado de proteína de suero



## RESUMEN

En las últimas décadas, los consumidores han tomado conciencia sobre la importancia de la alimentación sobre la salud, lo que ha promovido el consumo de alimentos saludables como los jugos de frutas y hortalizas, y las bebidas proteicas. El suero de leche es un importante subproducto de la industria láctea resultante de la elaboración de queso y caseína, cuya producción mundial se calcula en más de 180 a 190 millones de toneladas por año. Debido a sus deseables propiedades funcionales y alto valor nutricional, las proteínas de suero se han utilizado como ingrediente funcional en alimentos y bebidas. La aplicación de tratamientos térmicos para la inactivación de microorganismos, sin embargo, desnaturaliza parte de las proteínas del suero, y causa pérdida nutricional y cambios organolépticos de los alimentos. Por lo tanto, tecnologías emergentes como la luz UV-C y los antimicrobianos naturales como vainillina surgen como una alternativa promisoría para lograr la inactivación microbiana en este tipo de bebidas. La luz UV se ha utilizado como una tecnología para la desinfección del agua y descontaminación de superficies, recientes hallazgos han demostrado que el tratamiento con luz UV-C permite la inactivación de bacterias patógenas como *E. coli* y *L. monocytogenes* en jugos de frutas y productos lácteos. Adicionalmente, se ha reportado que vainillina (4-hidroxi-3-metilbenzaldehído), compuesto extraído de las vainas de *Vanilla planifolia*, tiene propiedades antioxidantes y es eficaz en la inactivación de bacterias transmitidas por alimentos. El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la luz UV-C sólo y en combinación con vainillina sobre la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en 3 formulaciones de bebidas proteicas elaboradas con proteína de suero de leche y jugo de manzana. Para ello, se inoculó las bebidas proteicas con dichos microorganismos y se sometieron a tratamiento UV-C por sí solo (0 - 20 min) o en conjunto con vainillina (0,1% p/v). Posteriormente se analizó el número de sobrevivientes por recuento en placa. Las bebidas proteicas fueron caracterizadas física y químicamente, éstas exhiben pH ácido y diferentes coeficientes de absorptividad que influyen en la transmisión de la luz UV-C y en el grado de inactivación microbiana alcanzado. La dosis UV-C entregada se calculó por reacción actinométrica resultando entre 0 y 47,72 kJ/m<sup>2</sup> a los 20 min de tratamiento UV-C. El tratamiento UV-C provocó reducciones entre 3,95 – 4,31 log UFC/mL de *E. coli* y 4,45 – 4,69 log UFC/mL de *L. innocua* en las bebidas proteicas. El tratamiento combinado de luz UV-C y vainillina (0,1% p/v) en las bebidas proteicas consiguió mayores niveles de inactivación entre 4,63 – 5,03 log UFC/mL de *E. coli* y 5,03 – 5,17 log UFC/mL de *L. innocua*. Las curvas de inactivación se modelaron aplicando las ecuaciones de Weibull, observándose que el parámetro *b* fue mayor en la mayoría de los casos en la formulación C, que presenta el menor coeficiente de absorptividad, que se relaciona a una mejor transmisión de la luz UV-C. Tanto las muestras procesadas con UV-C como las UV + vainillina obtuvieron valores de  $n < 1$  que

se vincula a una fuerte inactivación desde el comienzo del tratamiento y a una concavidad ascendente de la curva de supervivencia. La adición de vainillina en todas las formulaciones de bebidas proteicas provocó un aumento del valor de  $b$  respecto a las mismas bebidas tratadas solo con UV, indicando un mayor grado de inactivación microbiana y todas las formulaciones sometidas al tratamiento combinado presentaron  $n < 1$ . Además, el procesamiento de luz UV-C y vainillina en todas las bebidas produjo curvas más estrechas con mayor moda y con una marcada reducción en la dispersión (menor media y varianza), comparados con las bebidas tratadas sólo con UV-C. En el caso de *L. innocua* todas las curvas de inactivación, tanto las muestras procesadas con UV-C como los tratamientos combinados, exhibieron mayores valores de  $b$  y valores de  $n < 1$  y, lo que indicaría una mayor sensibilidad de *Listeria* frente a los tratamientos en comparación con *E. coli*. Por lo tanto, la aplicación de tecnologías emergentes como luz UV-C en combinación con antimicrobianos naturales es una alternativa promisoría para el tratamiento de alimentos líquidos opacos como las bebidas proteicas, asegurando la inocuidad de este tipo de producto.

## ABSTRACT

In recent decades, consumers have increased health awareness which has promoted the consumption of healthy foods, such as fruit and vegetable juices and protein beverages. Whey is an important by-product of the dairy industry resulting from the manufacture of cheese and casein, whose world production is estimated in more than 180 to 190 million tons per year. Due to its functional properties and high nutritional value, whey proteins have been used as a functional ingredient in foods and beverages. The application of heat treatments for the inactivation of microorganisms, however, denatures whey proteins, causing nutritional loss and organoleptic changes in foods. Therefore, emerging technologies such as UV-C light and natural antimicrobials such as vanillin emerge as a promising alternative to achieve microbial inactivation in this type of beverage. UV light has been used as a technology for water disinfection and surface decontamination, recent findings have shown that treatment with UV-C light allows the inactivation of pathogenic bacteria such as *E. coli* and *L. monocytogenes* in fruit juices and dairy products. Additionally, it has been reported that vanillin (4-hydroxy-3-methylbenzaldehyde), a compound extracted from *Vanilla planifolia* pods, has antioxidant properties and is effective in inactivating foodborne bacteria. The objective of this thesis was to study the effect of UV-C light alone and in combination with vanillin on *E. coli* and *L. innocua* inactivation in 3 formulations of protein beverages made with whey protein and apple juice. Protein beverages were inoculated with these microorganisms and subjected to UV-C treatment alone (0 - 20 min) or together with vanillin (0.1% w/v). Subsequently, the number of survivors was analyzed by plate count. Protein beverages were characterized physical and chemically, they exhibited acidic pH and different absorptivity coefficients that influence the transmission of UV-C light and the degree of microbial inactivation achieved. The UV-C dose delivered was calculated by actinometric reaction and was estimated between 0 and 47.72 kJ/m<sup>2</sup> at 20 min of UV treatment. UV-C treatment caused reductions between 3.95 - 4.31 log CFU/mL of *E. coli* and 4.45 - 4.69 log CFU/mL of *L. innocua* in protein beverages. The combined treatment of UV-C light and vanillin (0.1% w/v) in protein beverages achieved higher levels of inactivation, between 4.63 - 5.03 log CFU/mL of *E. coli* and 5.03 - 5.17 log CFU/mL of *L. innocua*. The inactivation curves were modeled by applying the Weibull equations, observing that the parameter *b* was higher in most cases in formulation C, which presented the lowest absorptivity coefficient, which is related to better transmission of UV-C light. Both the samples processed with UV-C and UV-C + vanillin obtained values of *n* < 1, which is associated with a strong inactivation from the beginning of the treatment and an upward concavity of the survival curve. The addition of vanillin in all the protein beverage formulations caused an increase in the value of *b* compared to the same beverages treated only with UV-C, indicating a higher degree of microbial inactivation and all the formulations subjected to the

combined treatment presented  $n < 1$ . In addition, UV-C light and vanillin processing in all beverages produced narrower curves with higher mode and with a marked reduction in spread (lower mean and variance), compared to beverages treated with UV-C only. In the case of *L. innocua*, all the inactivation curves, both the samples processed with UV-C and the combined treatments, exhibited higher values of  $b$  and values of  $n < 1$ , which would indicate a greater sensitivity of *Listeria* compared to *E. coli*. Therefore, the application of emerging technologies such as UV-C light and natural antimicrobials is a promising alternative for the treatment of protein beverages, ensuring the safety of this type of product.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Bebidas proteicas

Debido al creciente interés y conciencia de los consumidores acerca de la salud, sumado a la alta prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad y diabetes, ha impulsado a las personas a adoptar hábitos alimentarios saludables y estilos de vida activos. Estas tendencias han promovido el desarrollo de una amplia gama de alimentos funcionales que proporcionan beneficios directos al estado físico y bienestar mental de los consumidores (Villaño et al., 2022). En esta categoría, las bebidas funcionales han experimentado un rápido crecimiento, cuyo mercado ha sido estimado en 130 mil millones de dólares en el año 2021 con una tasa de crecimiento anual del 7,7% y se espera que llegue a 173 mil millones de dólares en 2025, según un informe de *Business Research Company* (Wood et al., 2020). Específicamente el consumo de bebidas a base de suero de leche ha aumentado año tras año principalmente entre atletas y personas involucradas en actividades físicas intensas, introduciéndose más de 4.100 productos alimenticios y bebidas que contienen proteína de suero de leche al mercado de EE.UU. (Chavan et al., 2015) y registrándose ventas por 40 mil millones de dólares en 2014 en este segmento (Ferreira et al., 2019). La producción de bebidas a base de suero comienza en la década de 1970 y en la actualidad se cuenta con una extensa serie de bebidas y formulaciones nutricionales a base de suero de leche con alto contenido de proteínas presentes en los diferentes mercados de alimentos y salud del mundo, aunque en Chile la oferta es aún escasa (Özer & Evrendilek, 2022).

El suero es un subproducto de la industria láctea de elaboración de queso y caseína, es un líquido translúcido que se obtiene de la separación de la cuajada de caseína de la leche y cuyo color depende del tipo y calidad de leche procesado (Mehmood et al., 2019; Singh & Geetanjali, 2016). Existen 2 tipos de suero relacionado al tipo de coagulación de la leche: “suero ácido” (pH 2,0 - 4,5) y “suero dulce” (pH 6,0 - 7,5). En el caso del suero ácido, la separación de la caseína se realiza mediante precipitación ácida en su punto isoeléctrico (pH  $\approx$  4,6) utilizando fermentación o adición de ácidos orgánicos o minerales. El uso de enzimas en la producción del queso, provoca una alteración de las proteínas de caseína (en micelas) y la liberación del suero dulce con ácidos orgánicos, minerales y proteínas solubles (Mehmood et al., 2019; Skryplonek et al., 2019).

La producción de 1 Kilogramo de queso a partir de aproximadamente 10 litros de leche genera hasta 9 litros de suero (85-90% del volumen de leche), por lo que la producción mundial total de suero se calcula en más de 180 a 190 millones de toneladas por año, con una tasa de

crecimiento anual del 2% pero solo alrededor del 50% se procesa para obtener proteína de suero de leche deshidratada (Lievore et al., 2015; Pereira et al., 2015). Por su alto contenido de lactosa y en menor medida de proteína, el suero de leche tiene una alta demanda biológica de oxígeno (DBO > 35.000 ppm) y elevada demanda química de oxígeno (DQO > 60.000 ppm), siendo este producto un contaminante de interés y su descarga a la atmósfera tiene un impacto considerable para el medio ambiente. Por lo tanto, el uso de suero contribuiría a mejorar la sostenibilidad ambiental y económica de la industria alimentaria y a la generación de productos útiles con valor agregado (Garay et al., 2021).

El suero es muy nutritivo debido a su alto contenido en agua y nutrientes, pero su uso es limitado debido a que es susceptible al crecimiento microbiano y se deteriora rápidamente en ausencia de conservantes o métodos de preservación (Zhao et al., 2021). Además, las proteínas del suero tienen una baja tolerancia al tratamiento térmico y comienzan a desnaturalizarse a temperaturas superiores a 60°C. Por este motivo, en la práctica comercial se deshidratan por secado *spray* para estabilizarlas microbiológicamente (Barukčić et al., 2008).

Los principales componentes del suero son el agua (93-94%) y sólidos totales (6-7%) que corresponden a lactosa (4,5-5%), proteínas solubles (0,7-0,9%), sales minerales (0,6-1,0%) y pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B (Zhao et al., 2021). Las proteínas de suero, que antiguamente se consideraban producto de desecho de la elaboración del queso, han recibido mucha atención por parte de los investigadores no solo por su disponibilidad, sino también porque tiene propiedades funcionales deseables y un alto valor nutricional superior a la proteína de huevo, carne y otras fuentes vegetales como la soya (Mehmood et al., 2019). Las principales proteínas del suero son  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG; 35% a 65%) y  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA; 12% a 25%) y en menores proporciones se encuentran albúmina de suero bovino (BSA), inmunoglobulinas (Ig) y lactoferrina (LF). El suero representa una rica fuente de aminoácidos esenciales, de cadena ramificada y azufrados tales como leucina, isoleucina y valina, así como también cisteína (Patel, 2015; Zhao et al., 2021). También está conformado en pequeñas cantidades por proteínas de interés comercial como la lactoperoxidasa (LP) y lisozima (Kassem, 2015).

El suero de leche se comercializa generalmente en tres formas: como concentrado de proteína de suero (WPC), aislado de proteína de suero (WPI) e hidrolizado de proteína de suero. En primer lugar, WPC es producido por ultrafiltración para eliminar agua, lactosa, y algunos minerales y contiene proteínas y componentes biológicamente activos en proporciones entre 29-89%. Por otra parte, WPI tiene un contenido de 90% o superior de proteína y es elaborado utilizando intercambio iónico y procesamiento por membranas como

microfiltración para eliminar la totalidad de lactosa y grasa. El hidrolizado es la forma semidigerida de la proteína que facilita su digestión y reduce la alergenicidad (Foegeding et al., 2011; Kassem, 2015).

Se han reportado varias funciones atribuidas a la proteína de suero que incluyen regulación de funciones metabólicas, homeostasis de glucosa, saciedad y atenuación de riesgos cardiovasculares (Barros et al., 2021; Ridge et al., 2018; Tahavorgar et al., 2015).  $\beta$ -LG es una proteína rica en el aminoácido cisteína y juega un rol principal en la síntesis de glutatión, que es un potente antioxidante celular con funciones antiinflamatorias, inmunomoduladoras y actividad anticancerígena al igual que LF, que exhibe potentes efectos antimicrobianos (Kamal et al., 2018; Rybarczyk et al., 2017). Adicionalmente, el contenido significativo de aminoácidos ramificados presentes en el suero permite la mantención de la masa muscular y el desempeño físico (Li et al., 2021).

Adicionalmente, las proteínas de suero exhiben interesantes características tecnofuncionales siendo usadas en aplicaciones que requieren actividad superficial tales como emulsiones, espumas y formación de redes como geles y películas comestibles (Foegeding et al., 2011). Debido a sus deseables propiedades funcionales y nutricionales, las proteínas de suero han encontrado aplicaciones en diferentes segmentos de la industria de alimentos, como nutrición deportiva, industria láctea, helados, carnes procesadas, productos horneados, sopas, pastas para untar, aderezos para ensaladas y sus formas más purificadas se usan para fines especializados como fórmulas nutricionales médicas y fórmulas infantiles (Kelly, 2019; Singh & Geetanjali, 2016). Dado que el suero es un prebiótico eficaz debido a la presencia de carbohidratos no digeribles como lactosa, últimamente ha aumentado su uso como ingrediente funcional en bebidas que son formuladas con diferentes jugos de frutas como frambuesa, uva, piña, guayaba, acerola, y pulpa de açaí (Amaral et al., 2018; Cappato et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Shukla, 2012; Silveira et al., 2019; Zoellner et al., 2009). La adición de jugos de frutas permite disimular el olor “cocido” y sabor agrio-salado del suero fresco, al mismo tiempo que aportan compuestos bioactivos con propiedades funcionales (Chavan et al., 2015). En este sentido, se ha descrito ampliamente que el jugo de manzana contiene gran cantidad de fibra, compuestos fenólicos (principalmente catequina, proantocianidinas, quercetina y ácido hidroxicinámico), triterpenoides como carotenoides, vitaminas (C y E) y minerales (potasio). Estos compuestos poseen potentes efectos antiinflamatorios, propiedades antioxidantes y acción antimicrobiana que disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, disfunciones respiratorias, cáncer y obesidad, entre otros múltiples beneficios (Bondonno et al., 2017; Hyson, 2011).

## 1.2. Inocuidad de los alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) causadas por la presencia de microorganismos patógenos (por ejemplo, bacterias, hongos, protozoos y virus) enferman a alrededor de 600 millones de personas por año, provocado 420.000 muertes (WHO, 2015). Por lo tanto, representan un importante problema de salud pública y dan lugar a cuantiosas pérdidas económicas (Hussain & Dawson, 2013).

Los jugos de frutas no se consideraban vehículos de ETAs hasta hace algunos años; sin embargo, los brotes de enfermedades asociadas con el consumo de jugo de frutas se han convertido en un problema de salud pública creciente desde principios de la década de 1990, informándose 21 brotes asociados con jugos de 1995 a 2005 por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Vojdani et al., 2008). El aumento de la resistencia de patógenos emergentes, como algunas cepas de *E. coli* O157: H7 y cepas de patógenos entéricos adaptadas al ácido y/o resistentes (especialmente *Salmonella* spp.) ha provocado brotes transmitidos por alimentos incluso en jugos de frutas pasteurizados (Quintero-Ramos et al., 2004). La sidra de manzana no pasteurizada y el jugo de manzana han sido asociados a brotes de infección por *E. coli* O157:H7 causantes de síndrome urémico hemolítico (SUH), *S. Typhimurium* y criptosporidiosis (Blackburn et al., 2006; CDC, 1997). Mientras que brotes de Hepatitis A y *S. Typhimurium* se vincularon con el consumo de jugo de naranja fresco (Frank et al., 2007; Jain et al., 2009). Por otra parte, *Clostridium botulinum* se ha relacionado con brotes asociados con jugo de zanahoria casero y enlatado comercialmente (Baysal, 2018). Aunque *L. monocytogenes* no se ha relacionado específicamente con un brote de enfermedad por jugo, este microorganismo es de naturaleza ubicua (Patras et al., 2021). Relacionados a productos lácteos, durante los años 2007-2012 se notificaron un total de 81 brotes asociados con leche no pasteurizada en los EE.UU., los que fueron causados principalmente por *E. coli*, *Campylobacter* spp., y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Mungai et al., 2015).

*Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* han sido ampliamente estudiados como patógenos potenciales capaces de sobrevivir en jugos de frutas y productos lácteos (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2005).

### 1.2.1. *Escherichia coli*

*E. coli* es una bacteria Gram negativa, anaeróbico facultativo que no forma esporas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. *E. coli* comprende un grupo grande y diverso de bacterias. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y comensales del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente, mientras que otras cepas han adquirido



características que las hacen patógenas para las personas. El pH óptimo para el crecimiento de este patógeno es 6,0 a 8,0, pero el crecimiento puede ocurrir a un pH ácido de hasta 4,3 y en ambientes básicos de 9 a 10 (Bintsis, 2017). Muchos de los patotipos se transmiten a través de medios ubicuos que incluyen agua y alimentos contaminados con heces de humanos o animales infectados e indirectamente a través de los entornos y equipos de trabajo, donde puede sobrevivir por extensos períodos de tiempo (Desmarchelier & Fegan, 2011). Particularmente, *E. coli* O157: H7 es una *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) que causa episodios de diarrea de leve a grave y el 5-10% de las personas infectadas por STEC desarrollan SUH, caracterizado por una profusa hemorragia que puede conducir a insuficiencia renal y muerte (Bintsis, 2017). En los últimos años, se han reportado numerosos brotes de infecciones por *E. coli* STEC O157:H7 y patotipos emergentes que involucran carne poco cocida, una variedad de productos frescos como espinacas, lechuga y semillas de fenogreco y mezclas de harinas, revelando que *E. coli* se ha convertido en un problema significativo de salud pública (CDC, 2020).

### **1.2.2. *Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* es un microorganismo Gram positivo que no forma esporas, anaerobio facultativo que se ha relacionado a múltiples brotes de enfermedades relacionados a leche cruda y los productos lácteos (Lundén et al., 2004). Puede crecer en pH de 4,0 a 9,6, con un crecimiento óptimo a pH 6,0 - 8,0 y a temperaturas de refrigeración. Este patógeno es ubicuo y ha sido aislado del suelo, agua, vegetales, heces de animales y áreas de procesamiento de alimentos persistiendo por años en estos ambientes, transmitiéndose a los seres humanos a través de alimentos contaminados y es considerado típicamente un contaminante post pasteurización (Bintsis, 2017; Ryser, 2011). Genera una infección denominada listeriosis con síntomas como gastroenteritis, septicemia, meningitis y abortos que afecta principalmente a grupos de consumidores vulnerables como recién nacidos, embarazadas, ancianos e inmunodeprimidos con una alta tasa de mortalidad (20-30%) (Dortet et al., 2009). Desde el año 2011 hasta la fecha, los brotes de *Listeria* se han asociado al consumo de melones, manzanas caramelizadas, helados, ensaladas listas para el consumo, quesos y embutidos (CDC, 2020). *Listeria innocua* (*L. innocua*) es una bacteria que es utilizada como microorganismo subrogante de *L. monocytogenes* en experimentos porque es una especie no infecciosa con similar susceptibilidad a los tratamientos (Char et al., 2009).

### **1.3. Deterioro de jugos y productos lácteos**

El mercado de jugos frescos y bebidas requiere que el producto tenga una vida útil de al menos 10 días en condiciones ideales de refrigeración (4°C). Se ha reconocido que los jugos de frutas ácidos, como el jugo de manzana o naranja, pueden ser deteriorados por levaduras, mohos y bacterias tolerantes al ácido. El deterioro visible del jugo ocurre por la producción de

ácido láctico, etanol, CO<sub>2</sub>, diacetilo y eventualmente mucílago, generando burbujas, opalescencia y/o olor a mantequilla (Antonio-Gutiérrez et al., 2019). La inactivación de bacterias y endosporas, incluidos los virus, es una preocupación importante en la industria de las bebidas, especialmente para el procesamiento de bebidas con baja acidez para minimizar el riesgo de deterioro o enfermedad (Patras et al., 2021). En productos lácteos, el deterioro es generado por bacterias Gram negativas (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, etc.), bacterias Gram positivas (*Paenibacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*) y un amplio espectro de organismos fúngicos a lo largo de todo el proceso de producción y procesamiento. Estos crecen rápidamente incluso a temperaturas de refrigeración, produciendo enzimas degradantes que generan malos olores, sabores, cambios de color y coagulación (Lu & Wang, 2017; Martin et al., 2021).

#### **1.3.1. *Saccharomyces cerevisiae***

*S. cerevisiae* generalmente deteriora los jugos después de que se producen a partir de diferentes tipos de frutas frescas (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2005). Es un hongo unicelular que está ampliamente distribuido en el medio ambiente que genera la fermentación de bebidas con una producción abundante de CO<sub>2</sub>, producción de malos olores y sabores, turbidez o formación de sedimentos causando significativas pérdidas económicas a la industria de alimentos (Stewart, 2014).

#### **1.4. Tratamientos térmicos para la preservación de alimentos**

La pasteurización térmica, la esterilización y la ultra alta temperatura (UHT) son las tecnologías más comunes utilizadas en la conservación de alimentos para garantizar la inocuidad y extender la vida útil comercial de los alimentos al eliminar los microorganismos patógenos y deteriorantes, así como promover la inactivación de enzimas (Delorme et al., 2020; Patras et al., 2021). Aunque son eficientes, los tratamientos térmicos pueden afectar negativamente las propiedades de los alimentos como el color, el olor, la textura y el sabor (Hernández-Hernández et al., 2019). Además, también puede causar una disminución en la calidad nutricional que implica desnaturalización de proteínas, oxidación de lípidos, pérdida de compuestos bioactivos, reducción de vitaminas e inactivación de enzimas (Delorme et al., 2020). La pasteurización térmica (90°C y 30 s) disminuyó significativamente el contenido de ácido ascórbico, carotenoides totales y terpenos en el jugo de mandarina (C. Cheng et al., 2020). El jugo de mango pasteurizado térmicamente (90°C por 60 s) mostró una reducción significativa en el contenido de carotenoides y polifenoles totales y una pérdida máxima de ácido ascórbico en comparación con el control no tratado (Santhirasegaram et al., 2015). Adicionalmente, se conoce que las proteínas del suero de leche (especialmente  $\alpha$ -LA y  $\beta$ -LG) conservan sus conformaciones nativas solo dentro de rangos de temperatura relativamente

limitados. La exposición de las proteínas de suero de leche a temperaturas superiores a 70°C en tratamientos térmicos da como resultado la desnaturalización y agregación de dichas proteínas (Anema, 2014). Finalmente, los procesos térmicos se encuentran entre las tecnologías que más consumen energía en la industria de alimentos e involucran altas inversiones en costos de capital (Choi & Nielsen, 2005; Menon et al., 2020).

### **1.5. Tratamientos emergentes para inocuidad alimentaria**

La creciente demanda de los consumidores por alimentos con características frescas, de alta calidad y libres de aditivos ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías no térmicas como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales (Antonio-Gutiérrez et al., 2019), que se están utilizando para mejorar inocuidad y prolongar la vida útil de los alimentos, al mismo tiempo que conserva la calidad nutricional o se añaden propiedades funcionales (Koutchma, 2019). Hoy en día, existe una amplia gama de tecnologías emergentes que funcionan mediante mecanismos de inactivación física o química a temperaturas ambiente o subletales. Estos tratamientos han sido investigados en jugos de frutas y lácteos y consideran el ultrasonido (US), alta presión hidrostática (HHP), campos eléctricos pulsados (PEF), luz pulsada (PL), luz ultravioleta de onda corta (UV-C), diodos emisores de luz ultravioleta (UV-LED) y ozono, entre otros (Fenoglio et al., 2019).

#### **1.5.1. Luz ultravioleta**

La luz ultravioleta de onda corta (UV-C) se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento del agua, la desinfección del aire y la descontaminación de superficies (Koutchma, 2008). En las últimas décadas, el tratamiento con luz UV-C se ha establecido como un tratamiento no térmico para alimentos líquidos como jugos de frutas y verduras, bebidas alcohólicas, refrescos, leche y productos lácteos (Singh et al., 2020). A nivel comercial se ha aplicado mayoritariamente a la industria de la sidra y los jugos (Biancaniello et al., 2018).

La luz UV es la radiación electromagnética con una longitud de onda (100 nm a 400 nm) que se encuentra entre los rayos X y la luz visible. Este rango de longitud de onda comprende cuatro regiones diferentes: (a) la región UV-A (320–400 nm) tiene la longitud de onda más larga y la energía más baja y puede broncear la piel humana; (b) la región UV-B (280-320 nm) tiene longitudes de onda medias que pueden causar bronceado, quemaduras solares y cáncer de piel; (c) la región UV-C, también llamada región de irradiación germicida UV (200-280 nm), que tiene una alta energía adecuada para la inactivación microbiana; y (d) la región UV de vacío (100-200 nm) que puede ser absorbida por casi todas las sustancias, pero es transmisible solo en vacío (Delorme et al., 2020; Singh et al., 2020).

La luz UV-A daña diferentes estructuras celulares debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que oxidan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con efecto germicida a altas dosis. Por otro lado, la luz UV-B inactiva bacterias mediante la formación de lesiones en el ADN como la luz UV-C y al dañar las estructuras celulares a través de ROS (Koutchma & Popović, 2019).

La luz UV presenta un amplio efecto germicida, siendo eficaz en la inactivación de una gran variedad de microorganismos patógenos y de descomposición, incluyendo bacterias, virus, protozoos, levaduras, mohos y algas (Souza & Koutchma, 2021). Los ácidos nucleicos suelen absorber longitudes de onda que van desde 200 a 300 nm, particularmente, la longitud de onda de 253,7 nm es la más aplicada debido al mayor efecto germicida en esta región (Shah et al., 2016). La absorción de la radiación UV-C induce cambios en el ADN y ARN de la célula microbiana, promoviendo la formación de dímeros de pirimidina que eventualmente conducen a mutagénesis y muerte celular (Baysal, 2018).

La luz UV-C ha sido aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA), la Unión Europea (UE) y Health Canada para aplicaciones en alimentos líquidos, como jugos y leche, como tratamiento alternativo a la pasteurización térmica de jugos de frutas (Souza & Koutchma, 2021). El Código de Regulaciones Federales de EE. UU. (21 CFR 179.39) estableció las siguientes condiciones para la irradiación UV para el procesamiento y tratamiento de alimentos: (a) Las fuentes de radiación consisten en lámparas de mercurio de baja presión que emiten el 90% de la emisión a una longitud de onda de 253,7 nm y, (b) Flujo turbulento a través de tubos con un número de Reynolds mínimo de 2200 para productos de jugo (FDA, 2012). Además, los productores deben asegurarse de que el tiempo de exposición a los rayos UV de la bebida tratada sea adecuado para lograr una reducción mínima de 5 log del patógeno concerniente, es decir, el microorganismo más resistente de importancia para la salud pública que es probable que se presente en dicho jugo. Health Canada no emitió objeciones en una decisión sobre “nuevos alimentos” sobre el uso de la unidad CiderSure 3500 UV para el tratamiento de jugo de manzana/sidra para reducir los niveles de patógenos microbianos (Koutchma, 2016). EFSA aprobó el uso de UV-C como tratamiento para el procesamiento de leche y pan en 2016, como se indica en la CE no. 258/97 (EFSA Panel on Dietetic Products, 2016). Además, el Codex Alimentarius (CAC/GL 88-2016; CAC/GL 79-2012) acepta el uso de luz ultravioleta como medida de control de parásitos en los alimentos y virus en la superficie de los alimentos; estas acciones deben utilizarse de acuerdo con las directrices de las autoridades competentes.

### **1.5.2. Factores que afectan el procesamiento UV**

Para los alimentos líquidos, la penetración de la luz UV-C depende del color, densidad óptica, viscosidad, turbidez, pH, espesor y composición química (Guerrero-Beltran & Barbosa-Cánovas, 2011). El coeficiente de absorción ( $\alpha$ ) describe la atenuación de la intensidad de la luz que pasa a través de un material ( $\text{cm}^{-1}$ ), el valor de  $\alpha$  de un alimento líquido en la tasa de inactivación microbiana es fundamental para producir un tratamiento UV-C eficaz. Por tanto, cuando aumenta el valor de  $\alpha$ , se genera una disminución en la capacidad de penetración de la luz UV-C en el alimento. En este sentido, un valor alto de  $\alpha$  reducirá significativamente la eficacia antimicrobiana del tratamiento a cualquier dosis de UV-C (Hinds et al., 2019). Los componentes de color, los sólidos en suspensión y los compuestos solubles pueden reducir la cantidad de fotones disponibles para matar microorganismos al absorber, reflejar y dispersar la luz incidental y proporcionar un sitio para la agregación de bacterias (Koutchma, 2019). La viscosidad y la densidad son propiedades físicas que pueden alterar la eficiencia de los rayos UV, ya que afectan el patrón de flujo en el sistema UV y la transferencia del impulso del fluido (Souza & Koutchma, 2021).

El rendimiento UV puede verse afectado por una serie de factores que incluyen: dosis UV (función de la irradiancia de la fuente y tiempo de exposición), potencia de la fuente de luz UV y longitud de onda y otras variables como volumen de trabajo, espesor del líquido y tasas de flujo que determinan como la dosis de UV se distribuye en el volumen total del líquido (Souza & Koutchma, 2021). Uno de los principales parámetros en el tratamiento UV es la dosis de UV que se asocia con la magnitud del daño del ADN y la capacidad de reparación de los microorganismos (Koutchma, 2009). En este sentido, es necesario diferenciar los términos "dosis o fluencia expuesta" que se refiere a la cantidad de energía o fotones administrados o incidentes sobre un objeto del reactor UV que no implica que sea totalmente absorbido y que se expresa en  $\text{J}/\text{cm}^2$  o  $\text{J}/\text{L}$ . Mientras que la "dosis/fluencia absorbida" representa la energía realmente absorbida por el objeto irradiado y la "dosis/fluencia administrada" se asocia a la energía disponible en el objeto que se administra a los microorganismos (Souza & Koutchma, 2021). La actinometría y la biodosimetría son dos métodos que se utilizan para calcular la dosis o la fluencia administrada en el procesamiento de alimentos con luz UV (Char et al., 2010; Koutchma & Parisi, 2004).

### **1.5.3. Equipos de luz UV-C**

Elegir la fuente de UV-C correcta es extremadamente importante, ya que puede aumentar la eficiencia de la inactivación microbiana al incrementar la penetración de la luz UV en los alimentos (Delorme et al., 2020). Las fuentes de luz UV-C disponibles incluyen la lámpara de

mercurio de baja presión (LPM) y la lámpara de mercurio de presión media (MPM), las lámparas excímeras y más recientemente los diodos emisores de luz (LED) (Koutchma, 2009). LPM y MPM se han utilizado con éxito en el tratamiento de agua durante casi 50 años y en tratamientos de desinfección que se benefician de su rendimiento, bajo costo y calidad (Koutchma et al., 2009). Las lámparas LPM y de amalgama de baja presión (LPA) producen luz UV-C a 253,7 nm como un haz continuo en un modo monocromático y se utilizan principalmente en la industria de desinfección de alimentos y agua. Las lámparas MPM emiten luz policromática más potente entre 250 y 600 nm con líneas de emisión en las regiones de luz UV y visible y estas lámparas funcionan a temperaturas más altas.

Los principales tipos de sistemas UV incluyen un reactor UV anular de película delgada que ha sido diseñado para disminuir la longitud del camino y así evitar problemas asociados con la falta de penetración (Koutchma, 2009). Los reactores de película delgada se caracterizan por un flujo laminar con un perfil de velocidad parabólico, observándose una velocidad máxima en el centro que es el doble de la velocidad promedio del líquido (Koutchma & Parisi, 2004). El reactor CiderSure y el reactor UV de flujo Taylor-Couette son dos diseños de reactor UV de películas delgadas que se han utilizado para la inactivación microbiana en alimentos líquidos (Forney et al., 2004; Koutchma et al., 2006; Usaga et al., 2015).

Un segundo enfoque de diseño aumenta la turbulencia dentro del reactor UV, proporciona una homogeneidad mejorada de la partícula de flujo y, teóricamente, cada volumen del producto estará expuesto a la luz UV debido a una mejor mezcla. Este reactor de flujo Dean contiene un tubo de teflón enrollado con lámparas UV y reflectores colocados tanto dentro como fuera del tubo enrollado, promueve turbulencia adicional y provoca un efecto secundario de flujo (Koutchma, 2009). Diferentes investigaciones han utilizado el reactor de flujo Dean para lograr mayores reducciones microbianas al tratar jugos de frutas y leche (Biancaniello et al., 2018; Fenoglio et al., 2020; Geveke, 2008; Ward et al., 2018).

Los sistemas UV comerciales se han desarrollado para lograr una mayor eficacia de rendimiento de la luz UV en productos con baja transmisión de rayos UV, como CiderSure (FPE Inc., NY, EE. UU.), SurePure (SurePure Inc., Milnerton, Sudáfrica); Salcor, CA, EE. UU. y Aseptoray (MGT Industries Ltd., Ma'alot, Israel).

#### **1.5.4. Mecanismo de inactivación microbiana por luz UV-C**

El rendimiento de inactivación del procesamiento de luz UV depende en gran medida de las características del microorganismo objetivo. La sensibilidad a la luz UV de los microorganismos varía significativamente según la estructura de la pared celular, el grosor, la composición, la presencia de proteínas absorbentes de luz UV o las diferencias en la estructura de los ácidos nucleicos, así como la capacidad de reparación (Tran & Farid, 2004).

El patrón de mayor a menor resistencia de las células microbianas a la luz UV-C corresponde a: protozoos > virus > mohos > esporas bacterianas > levaduras > Gram positivos > Gram negativos (Souza & Koutchma, 2021). Debido a su mayor tamaño celular o estructura de la pared celular, se ha informado que las bacterias Gram positivas son más resistentes que las bacterias Gram negativas. Las levaduras y los mohos exhiben una mayor resistencia a los rayos UV-C que las bacterias, lo que se asocia con su mayor tamaño y forma que requiere una mayor dosis de rayos UV para la inactivación (Baysal, 2018; Char et al., 2010). La cepa, el estado del cultivo, la densidad del microorganismo y las características del medio de crecimiento también influyen en el efecto germicida de la luz UV-C (Antonio-Gutiérrez et al., 2019).

La absorción de la radiación UV-C induce cambios en la expresión génica del ADN con la formación de fotoproductos, denominados dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) y fotoproductos pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PP) (Brem et al., 2017; Gayán et al., 2014). Esos fotoproductos, en particular los CPD, inhiben la transcripción y replicación del ADN (Koutchma, 2009).

La resistencia UV-C microbiana está fuertemente relacionada con la capacidad del microorganismo para reparar el daño causado por la radiación UV. La fotorreactivación y la reparación oscura son dos mecanismos enzimáticos que los microorganismos utilizan para reparar el daño del ADN hasta cierto punto (Patras et al., 2021). La fotorreactivación consiste en revertir las lesiones del ADN mediante la acción de la enzima fotoliasa utilizando la energía de la luz visible (Baysal, 2018). La enzima fotoliasa escinde los dímeros de pirimidina formados por la exposición a los rayos UV, aprovechando la energía de la luz azul o UV cercano para catalizar esta reacción, restaurando los componentes de pirimidina individuales (Koutchma, 2014). Por lo tanto, algunos microorganismos en el agua y los alimentos tratados con luz UV pueden reactivarse si se exponen a la luz durante el almacenamiento, lo que tiene importantes implicancias en la eficiencia de inactivación por luz UV (Koutchma, 2014). Por otro lado, en la reparación oscura, el sitio dañado del ADN se escinde y se reemplaza con la base correcta utilizando la hebra complementaria molde sin necesidad de la presencia de la luz (Patras et al., 2021). Este es un proceso de escisión de nucleótidos que involucra varias enzimas que es menos eficiente que la fotorreactivación y no siempre conduce a una reparación completa (Koutchma, 2014).

#### **1.5.5. Inactivación microbiana en alimentos mediante luz UV**

La luz UV para el procesamiento de alimentos líquidos se ha estudiado ampliamente, en particular para jugos de frutas y vegetales, lo que demuestra claramente su potencial para promover una reducción significativa de bacterias, virus, mohos y levaduras patógenos

transmitidos por los alimentos y, en consecuencia, permitir la extensión de la vida útil (Souza & Koutchma, 2021).

En sidra de manzana ( $\text{pH } 3,65$ ,  $\alpha = 17,41 \text{ cm}^{-1}$ ), se analizó el efecto de la dosis UV-C de  $50 \text{ mJ/cm}^2$  en la inactivación de *E. coli* ATCC 8739 usando un equipo UV Taylor-Couette, reportándose que el tratamiento UV consiguió una inactivación de  $4,76 \text{ log}$  de *E. coli* sin afectar las características de frescura de la sidra (Orlowska et al., 2014). Caminiti et al. (2012) observaron reducciones logarítmicas de  $4,83$  y  $4,59$  para *L. innocua* y *E. coli* en jugo de manzana ( $\alpha = 5,81 \text{ cm}^{-1}$ ) a dosis de UV de  $53,10 \text{ J/cm}^2$ . El tratamiento UV no afectó el pH, °Brix o el contenido total de fenoles, pero disminuyó el pardeamiento no enzimático ( $p < 0,01$ ) y la capacidad antioxidante (11%) en comparación con el jugo sin procesar en dosis de  $2,66$  a  $53,10 \text{ J/cm}^2$  (Caminiti et al., 2012). Char et al. (2010) analizó la supervivencia de una cepa o cóctel de *E. coli* en jugo de manzana ( $\text{pH } 3,1$ ;  $12 \text{ }^\circ\text{Brix}$ ) que fueron procesados por UV-C. Se logró una reducción logarítmica de  $4,5$  de *E. coli* ATCC 35218 en los primeros 5 minutos de tratamiento con luz UV-C en jugo de manzana. Cuando se compararon las curvas de supervivencia de la cepa y su cóctel, se encontraron inactivaciones similares y este efecto fue dependiente del tipo de microorganismo y del tratamiento. Además, se observaron curvas de inactivación con concavidad ascendente y cola en agua de peptona y jugo de manzana, es decir, queda una fracción de células viables de alta resistencia (Char et al., 2010). Sin embargo, en jugo de naranja, se observó una baja eficiencia de inactivación del tratamiento UV relacionada con la presencia de compuestos coloreados y partículas de fibra que disminuyen la transmisión de luz UV-C (Char et al., 2010). En jugo turbio de naranja y mandarina, Fenoglio et al. (2019) examinó la resistencia a los rayos UV de *S. cerevisiae* KE 161 o su combinación con 3 cepas de levaduras. Se logró una reducción de entre  $3,9$  y  $4,3 \text{ log}$  de *S. cerevisiae* o su inóculo compuesto a una dosis de UV-C de  $1720 \text{ mJ/cm}^2$ . La inactivación de *S. cerevisiae* fue menos efectiva en presencia del cóctel de levaduras, probablemente debido a una menor transmisión de luz. Además, no se informaron cambios en el pH, °Brix, turbidez y color de la mezcla de jugo expuesta a la luz UV-C (Fenoglio et al., 2019).

En la leche desnatada ( $\alpha = 170 \text{ cm}^{-1}$ ) se lograron reducciones de  $7,8 \text{ log}$  de *E. coli*, mientras que en la leche entera ( $\alpha = 220 \text{ cm}^{-1}$ ) la reducción máxima de *E. coli* fue de  $4,1 \text{ log}$ . Para esporas de *B. cereus*, se informaron reducciones máximas de  $2,72$  y  $2,65$  en la leche desnatada y entera, respectivamente, con valores de  $Re$  de  $1,024$  y  $713$  (Choudhary et al., 2011). Barut et al. (2021) utilizaron un reactor UV de película delgada. *E. coli* DH5 $\alpha$  y *L. innocua* alcanzaron  $4,58 \text{ log}$  y  $3,19 \text{ log}$  de inactivación, respectivamente, a una dosis de  $2,978 \text{ J/L}$  en leche UHT al  $3,8\%$  de grasa ( $\alpha = 896 \text{ cm}^{-1}$ ) (Barut et al., 2021). Ward et al. (2018) trabajaron con el reactor UV en espiral con flujo tipo Dean, donde se generan vórtices Dean



que permiten una distribución homogénea de la dosis UV en el líquido. Los autores informaron disminuciones en las cargas microbianas de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y virus MS2 y T1UV de más de 5 log en la leche desnatada tratada con dosis de UV de hasta 168,33 mJ/cm<sup>2</sup> (Ward et al., 2018). Se informaron reducciones superiores a 6 log para las bacterias estudiadas como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* a una dosis UV de 21,3 mJ/cm<sup>2</sup> en leche entera, mientras que la flora nativa de la leche se inactivó en 3-4 log a la misma dosis UV (Lu et al., 2011).

La luz UV es un proceso en frío y limpio ya que no incorpora sustancias químicas, y dado que la inactivación de microorganismos es el resultado de la energía de la radiación, no se producen cambios indeseables en las propiedades de calidad de los alimentos. Es una opción económica para la desinfección en comparación con los métodos de procesamiento comunes, que requiere bajo costo de fabricación, fácil instalación, operación y mantenimiento (Guerrero-Beltran & Barbosa-Cánovas, 2011; Koutchma et al., 2019). No se forman subproductos tóxicos o no tóxicos no conocidos significativos durante el tratamiento con UV-C (Koutchma, 2016). Adicionalmente, como tecnología de procesamiento de alimentos no térmica, la irradiación UV-C tiene una imagen positiva para el consumidor (Patras et al., 2021). Caminiti et al. (2012) informaron que las muestras tratadas con dosis de luz UV de hasta 10,62 J/cm<sup>2</sup> eran comparables al control en términos de aceptabilidad, aunque dosis iguales o superiores a 26,55 J/cm<sup>2</sup> produjeron efectos adversos en términos de sabor y color en jugo de manzana. Por este motivo, se debe minimizar la intensidad de este tratamiento UV para evitar la pérdida de calidad como efecto no deseado, logrando esto combinándolo con otras técnicas (Char et al., 2010). Aparentemente, el uso de UV-C como único factor de conservación no permite obtener un producto alimenticio con las características deseadas de alta calidad, seguridad y estabilidad; en general, una combinación de factores de conservación aplicados con menor intensidad es un método más factible (López-Malo & Palou, 2004).

## **1.6. Antimicrobianos naturales**

En los últimos años, los consumidores han manifestado su rechazo por el uso de conservantes y aditivos sintéticos (como sorbatos y benzoatos) en alimentos y bebidas debido a su asociación con problemas a la salud, surgiendo un gran interés acerca de alternativas de origen natural que permitan prevenir el crecimiento microbiano en alimentos. Los antimicrobianos naturales por sí solos o en combinación con otros factores de estrés aparecen como una interesante solución para conseguir la inocuidad de alimentos además de otorgar multiplicidad de sabores que captan la atención del consumidor (Ferrario et al., 2020; Schenk et al., 2018).

### 1.6.1. Vainillina

Vainillina (4-hidroxi-3-metilbenzaldehído) es el principal compuesto fenólico extraído de las vainas de *Vanilla planifolia* que es ampliamente usado como agente saborizante de una variedad de productos como bebidas, helados, productos horneados, postres, así también en la industria farmacéutica y cosmética (Ferrante et al., 2007). En alimentos complejos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, ha exhibido propiedades antioxidantes, por lo tanto, tiene el potencial de usarse como conservante de alimentos (Burri et al., 1989). Adicionalmente, la vainillina es un agente reconocido como seguro (GRAS) por la FDA (Ferrante et al., 2007).

Ha exhibido múltiples propiedades tales como efectos anti-mutagénicos, anti-cáncer, anti-metástasis, antidiabéticas y potente actividad antioxidante (Elsherbiny et al., 2016; King et al., 2007; Kumar et al., 2004; Lirdrapamongkol et al., 2005). En alimentos, al igual que muchos otros compuestos fenólicos de bajo peso molecular, la vainillina muestra efectos inhibitorios significativos sobre el crecimiento de diversos microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras en jugos, bebidas y purés de frutas (Fitzgerald et al., 2004; Gabriel & Pineda, 2014; Moon et al., 2006; Tomadoni et al., 2015).

El mecanismo del efecto antimicrobiano de vainillina se relaciona a que a bajas concentraciones altera la actividad de ciertas enzimas relacionadas a la producción de energía, mientras que altas concentraciones provoca la desnaturalización de proteínas. Esto se asocia a la habilidad de los compuestos fenólicos de alterar la permeabilidad celular de los microorganismos por su naturaleza hidrofóbica, al interactuar con proteínas y lípidos de membrana (Ferrario et al., 2020). La adición de vainillina resulta en la disipación de gradientes de iones, pérdida de homeostasis del pH y la inhibición de respiración celular de una manera especie-específica (Fitzgerald et al., 2004). Además, las mediciones de la absorción de yoduro de propidio indicaron que las membranas celulares de diferentes cepas de *Cronobacter* estaban dañadas por la exposición a vainillina (Yemiş et al., 2011).

### 1.6.2. Inactivación microbiana en alimentos adicionados con vainillina

Concentraciones de 20 y 10 mM de vainillina, respectivamente, fueron requeridos para alcanzar una inhibición completa de *S. cerevisiae* y *C. parapsilosis* en jugo de manzana y bebidas con sabor a durazno durante el almacenamiento de 8 semanas a 25°C (Fitzgerald et al., 2004). En el día 3 de almacenamiento a 5°C se alcanzaron reducciones de 2,4 log de *E. coli* O157:H7 en jugo de frutilla con vainillina 16 mM, mientras que al quinto día de almacenamiento de 5°C ya no se detectaron supervivientes en las muestras de jugo con vainillina (Tomadoni et al., 2015). En endospermo líquido de coco (pH 5,01; 5,2° Brix), el

tiempo de reducción decimal a 55°C de *E. coli* O157:H7 fue de 29,43 min cuando se agregó vainillina en concentraciones de 250 ppm (Gabriel & Pineda, 2014).

El efecto de la vainillina depende de diversos factores físicos y químicos del medio de cultivo o alimento evaluado. Delaquis et al. (2005) determinaron la concentración inhibitoria mínima (MIC) de vainillina para varias especies de *Listeria* en medios de laboratorio a varios niveles de pH. Las MIC informadas para *L. monocytogenes* y *L. innocua* a pH 5,0 fueron de 20 y 23 mM (0,3 y 0,35 % p/v), respectivamente, lo que sugiere que la primera era ligeramente más sensible al efecto inhibitorio de vainillina (Delaquis et al., 2005). Moon et al. (2006) determinaron la efectividad de adición de vainillina (40; 80 mM) en la viabilidad de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 inoculados en jugo de manzana a dos valores de pH (3,5 o 4,5). La suplementación con vainillina 40 mM ejerció un efecto letal que dependía de la especie, la concentración, el pH y la temperatura. *E. coli* O157: H7 fue más sensible a la vainillina que *L. monocytogenes*, y no se pudieron recuperar células viables después de 2 días de incubación a 4°C o 15°C. Esto muestra que la vainillina produce un efecto a largo plazo que previene el crecimiento microbiano de cualquier célula bacteriana que pudiera haber sobrevivido durante el almacenamiento en refrigeración (Moon et al., 2006).

También se ha analizado el efecto de la adición de vainillina en la inactivación microbiana en productos lácteos. Tipparaju et al. (2004) proporcionaron evidencia de que el principio activo de la vainilla mejora la destrucción de *L. monocytogenes* en el yogur, un producto alimenticio de alta acidez, durante el almacenamiento a 8°C por 31 días. Se reportaron reducciones de 2,5 y 3,5 log de *L. monocytogenes* en yogur bajo en grasas y yogur sin grasa saborizados con vainillina, respectivamente. Estos hallazgos se asociaron al efecto protector de la grasa en los microorganismos y la posible solubilización de los compuestos fenólicos en la fase lipídica, lo que hace que no esté disponible para la inhibición de los patógenos (Tipparaju et al., 2004). La presencia de vainillina (900 a 1800 ppm) aumentó la tasa de mortalidad de *L. monocytogenes* en la leche desnatada a bajas temperaturas de pasteurización (55°C-58°C), mientras que a temperaturas más altas, este efecto fue menos evidente y predominó el efecto térmico. Las curvas de supervivencia mostraron una forma convexa, con un hombro seguido de una tasa de muerte acelerada, sin efecto de cola, independientemente de la temperatura y la concentración de vainillina en la leche (Cava-Roda et al., 2012). En leche fermentada, la incubación con vainillina 0,6 mM por 48 horas tiene una actividad inhibitoria significativa en *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum* y *Actinomucor elegans*, al disminuir la tasa de crecimiento, aumentar la fase lag y disminuyendo la biomasa de micelio (Pei et al., 2021).

La aplicación industrial de antimicrobianos naturales incluye dos aspectos importantes, la validación de estudios *in vitro* en alimentos reales y los cambios sensoriales que imparten a los alimentos cuando se agregan. Char et al. (2009) describieron que la adición de vainillina al jugo de naranja generó una ligera modificación del sabor del jugo debido al proceso de conservación (adición de vainillina y tratamiento térmico suave), la aceptación general del jugo fue satisfactoria con un valor promedio de 6,5 en una escala hedónica de 9 puntos (1 = "disgusto extremadamente"; 9 = "me gusta mucho") (Char et al., 2009). Se debe continuar investigando el efecto de vainillina en la inactivación de microorganismos deteriorantes y patógenos en combinación con nuevas tecnologías de procesamiento como el tratamiento UV, sin que se requieran altas concentraciones de antimicrobianos naturales que puedan alterar las características organolépticas a los alimentos.

### **1.7. Tecnología de obstáculos**

La tecnología de obstáculos o métodos combinados representa una alternativa para procesar alimentos que sufren pérdida de calidad debido a los tratamientos térmicos tradicionales. La combinación de dos o más tecnologías de procesamiento puede resultar en efectos aditivos o sinérgicos en la inactivación de patógenos alimentarios (Leistner, 2000). En este sentido, se ha investigado el uso de antimicrobianos naturales en combinación con nuevas tecnologías de procesamiento no térmicas de alimentos o calentamiento suave para alcanzar el efecto de inactivación microbiana requerido y producir, de esta manera, alimentos mínimamente procesados que satisfaga la creciente demanda de los consumidores de alimentos de alta calidad y sin conservantes sintéticos (Alzamora et al., 2003; Char et al., 2010).

Se ha analizado la combinación de tratamiento UV-C junto a antimicrobianos naturales. En un sistema discontinuo, dosis de UV-C de 5,04 kJ/m<sup>2</sup> junto con nisina (7,81 µg/mL) en jugo de naranja, lograron una reducción de más de 1,7 log esporas de *A. acidoterrestris* a los 6 min de tratamiento, mientras que el tratamiento UV de 15 min reduce las esporas bacterianas solo en 1,0 log (Ferreira et al., 2020). Beristaín-Bauza et al. (2018) analizaron el efecto del tratamiento UV-C y vainillina en la reducción de *S. Typhimurium* en agua de coco. El agua de coco tratada con luz UV-C durante 7 min almacenada a 5°C y añadida con vainillina o cinamaldehído (100 µg/mL) mostró una fase de retraso de 4 días en el crecimiento bacteriano respecto de los controles o no presentó crecimiento de *S. Typhimurium* durante 30 días, respectivamente (Beristaín-Bauza et al., 2018). Se ha reportado que un tratamiento UV-C (390 mJ/cm<sup>2</sup>) aplicado a jugos mezcla de naranja-mandarina y jugo de naranja-plátano-mango-kiwi-frutilla consiguió reducciones de 3,7-3,8 log, 2,4-3,6 log y 1,5–1,6 log de *E. coli* ATCC 25922, *L. plantarum* ATCC 8014 y *S. cerevisiae* KE 162, respectivamente. Para *E. coli* se observó una inactivación adicional de 0,7 a 3,1 reducciones logarítmicas cuando se

agregaron antimicrobianos (vainillina 1000 ppm y citral 100 ppm) y cuando se aplicó luz UV-C, vainillina y tratamiento térmico suave (50°C) respectivamente. En el caso de *S. cerevisiae*, se alcanzaron 0,5 a 2,7 reducciones logarítmicas adicionales para el tratamiento UV y antimicrobianos naturales y para los 3 métodos combinados nombrados anteriormente respectivamente en ambos jugos. Esto demuestra que la adición de antimicrobianos a los jugos tratados con UV-C mostró efectos aditivos y sinérgicos sobre *E. coli* y *S. cerevisiae* durante el almacenamiento refrigerado (Ferrario et al., 2020). Por lo tanto, la aplicación de luz UV-C en conjunto con antimicrobianos naturales es una alternativa promisorio para el tratamiento de jugos y productos lácteos, asegurando la inocuidad de estos productos alimenticios.

## 2. HIPÓTESIS

*“El tratamiento combinado de luz UV-C y el antimicrobiano natural vainillina reducirá la carga microbiana en bebidas proteicas a base de proteína de suero de leche y jugo de manzana”.*

## 3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la luz UV-C y del antimicrobiano natural vainillina sobre la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en bebidas proteicas a base de proteína de suero de leche y jugo de manzana.

## 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Objetivo específico 1.** Formular y caracterizar física y químicamente las bebidas proteicas a base de proteína de suero de leche y jugo de manzana.

**Objetivo específico 2.** Evaluar la efectividad de los tratamientos con luz UV-C para inactivar *E. coli* y *L. innocua* en bebidas proteicas a base de proteína de suero de leche y jugo de manzana.

**Objetivo específico 3.** Analizar el efecto del tratamiento combinado de UV-C y vainillina para inactivar *E. coli* y *L. innocua* en bebidas proteicas a base de proteína de suero de leche y jugo de manzana.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos**

A continuación, se indican los insumos adquiridos y proveedores respectivos para el desarrollo de la presente tesis:

Ácido cítrico (Matheson Coleman & Bell, Cincinnati, Ohio, EE.UU.).

Ácido láctico (Merck, Darmstadt, Alemania).

Agar tripteína de soya (Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, EE.UU.).

Agua de peptona (Merck, Darmstadt, Alemania).

Caldo Tripteína de soya (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).

Detergente alcalino con espuma controlada WK-790 (Winkler Ltda, Santiago, Chile).

Detergente neutro de espuma controlada WK-810 (Winkler Ltda, Santiago, Chile).

Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania).

Fenofaleína (Merck, Darmstadt, Alemania).

Hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania).

Lactoprin 80 (concentrado de proteína de suero de leche 80% p/p, WPC) (Prinal, Santiago, Chile).

Vainillina (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.).

### **5.2. Cepas bacterianas**

Las cepas *E. coli* ATCC 35218 y *L. innocua* ATCC 33090 se utilizaron como microorganismos modelo en este estudio.

### **5.3. Preparación de bebidas**

Las bebidas proteicas fueron preparadas con los siguientes reactivos: WPC 80% p/p para facilitar el manejo de los ingredientes y estandarizar el proceso de fabricación y estabilidad

microbiológica; jugo de manzana comercial adquirido en el mercado local (L'Onda, Lima, Perú), clarificado y sin preservantes; agua estéril para reconstituir el WPC y edulcorante líquido Stevia (5 gotas/100 mL).

Se elaboraron formulaciones de bebidas proteicas con diferentes concentraciones de los componentes con el objeto de evaluar bebidas con diferentes coeficientes de absorbancia, lo cual determina la disponibilidad de fotones de luz UV-C en el líquido tratado y la consiguiente tasa de inactivación microbiana. Las formulaciones de bebidas se realizaron con una suspensión de WPC 30 g/L en proporciones entre 60-80% y de jugo de manzana entre 20-40% respectivamente (Tabla 1). El pH de las bebidas 80-20% fueron ajustados a pH 4,5 mediante acidificación con ácido cítrico. Las bebidas fueron caracterizadas física y químicamente midiendo el pH, sólidos solubles, acidez titulable, coeficiente de absorción, color y viscosidad.

**Tabla 1. Formulaciones de bebidas proteicas.**

<b>Formulación</b>	<b>Suspensión de proteína de suero (P)</b>	<b>Conc. WPC (g/L)</b>	<b>Jugo de manzana (JM)</b>
<b>Bebida A</b>	60%	30	40%
<b>Bebida B</b>	70%	30	30%
<b>Bebida C</b>	80%	30	20%

#### **5.4. Propiedades físicas y químicas de las bebidas**

El pH se midió con un pHmetro (pH21, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE.UU.).

El contenido de sólidos solubles se determinó utilizando un refractómetro digital (RX-1000 Atago, Atago Co, Carnation, WA).

La acidez titulable se calculó mediante titulación potenciométrica con una solución de NaOH 0,1 m/L hasta pH 8,1. Los resultados se expresaron en g/mL del principal ácido orgánico (ácido málico) según el método oficial AOAC 942.15 (AOAC, 2000).

La transparencia de las bebidas se determinó midiendo la absorbancia de las muestras en cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor utilizando un espectrómetro UV/visible (UNICAM UV3, Cambridge, Inglaterra) a 254 nm.

El coeficiente de absorción ( $\text{cm}^{-1}$ ) se calculó midiendo la absorbancia de diferentes diluciones de las bebidas proteicas y determinando la pendiente del gráfico de absorbancia versus concentración.



El color de las bebidas se midió en la escala CIELab con el espectrocolorímetro Lab Scan XE (Hunter Associates Laboratory, Reston, VA). El colorímetro se estandarizó con el azulejo estándar blanco caracterizado por: X = 79,71; Y = 84,49; Z = 84,49.

La viscosidad se determinó con un viscosímetro DV-II + PRO (Brookfield Engineering Labs Inc., Middleboro, MA) a 15,9°C. La velocidad de rotación del husillo fue de 200 rpm.

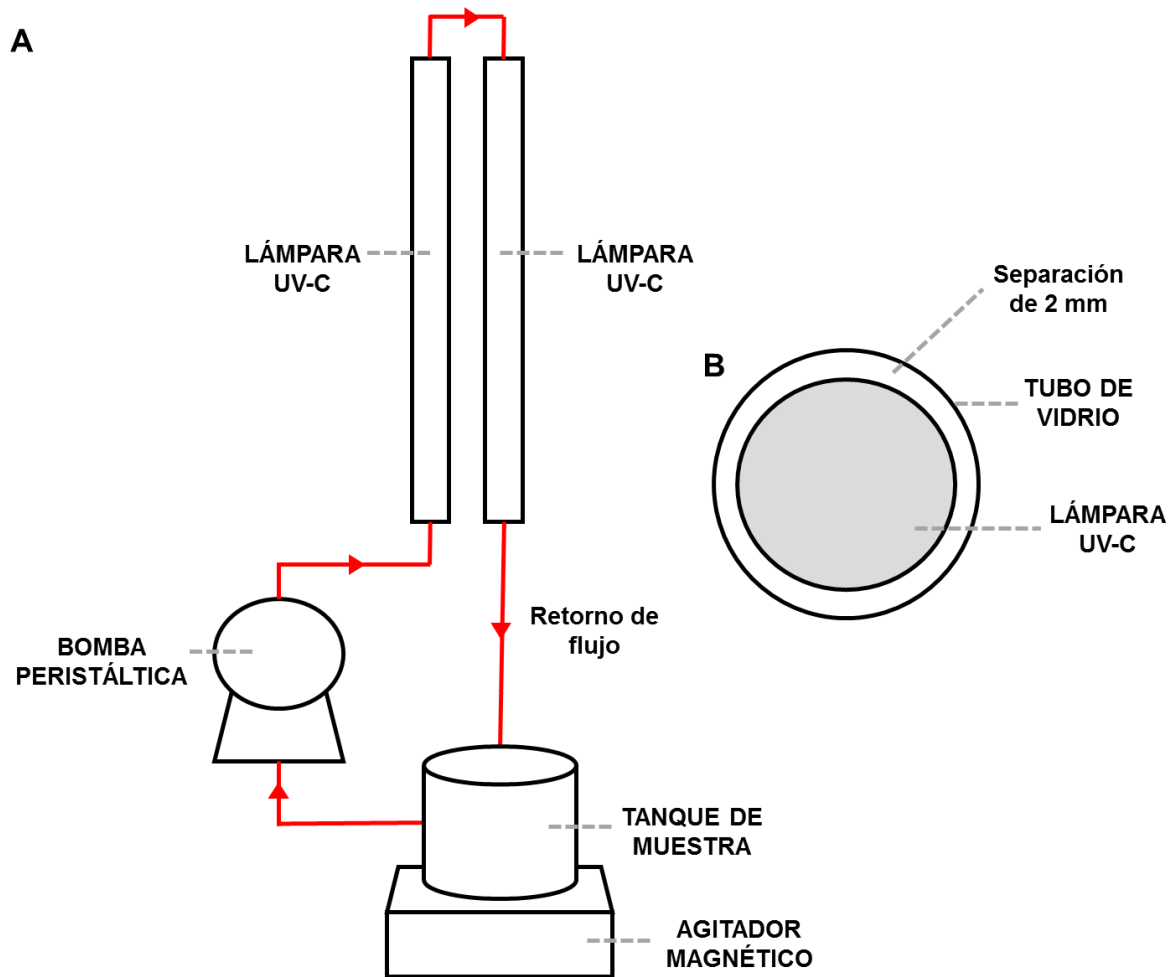
## **5.5. Preparación de inóculos**

Los inóculos de *E. coli*/*L. innocua* se prepararon transfiriendo un asa llena de cultivo madre (stock en glicerol mantenido a -18°C) a 25 mL de Caldo Tripteína de Soya (digestión pancreática de caseína 17,0; digestión enzimática de soya 3,0; cloruro de sodio 5,0; di hidrogenofosfato de potasio 2,5; glucosa 2,5) y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase estacionaria ( $\approx$  24 h). Para cada ensayo, se agregaron 2 mL de inóculo a 600 mL de bebida proteica para obtener una concentración inicial de  $\sim 10^6$ - $10^7$  UFC/mL de las bacterias.

## **5.6. Tratamientos UV-C**

### **5.6.1. Fuente de luz UV-C**

Se utilizó un equipo UV-C de flujo continuo de capa delgada constituido por 2 LPM UV-C (36 W, Phillips) con peak máximo de emisión a 254 nm conectadas en serie. Cada lámpara está cubierta por tubos de vidrio de 120 cm de largo, dejando un espacio anular de 2 mm por donde circula el fluido para su tratamiento. Las bebidas proteicas (600 mL) se recircularon por el equipo con ayuda de una bomba peristáltica (Masterflex model N°7553-85, Cole-Parmer Instrument Company, USA) a una velocidad de 7,7 mL/s (Figura 1). Las muestras se agitaron continuamente durante el tratamiento UV-C con un agitador magnético (Janke & Kunkel KG, Alemania).



**Figura 1. Montaje de equipo UV-C de flujo continuo.** A: Diagrama que muestra el sistema UV-C usado en esta tesis. B: Vista transversal de tubo de vidrio con lámpara UV por donde circuló la muestra de bebida proteica.

Antes de su uso, el equipo se sometió a un procedimiento de limpieza en el lugar (*in situ*) con agua destilada estéril con hipoclorito al 5% v/v que se hizo circular durante 5 minutos. Posteriormente, se pasó agua estéril para enjuague del equipo durante 5 min y luego las lámparas UV-C se encendieron durante 20 min antes del tratamiento UV para minimizar fluctuaciones en intensidad y esterilizar el equipo. Después de cada ensayo el equipo se enjuagó con agua y se recirculó hidróxido de sodio 0,1% p/p por 10 min, posteriormente se enjuagó nuevamente con agua y se limpió el equipo con ácido láctico 0,1% v/v por 10 min. Finalmente, se enjuagó con agua y se recirculó con hipoclorito de sodio 5% v/v por 10 min con un enjuague final con agua estéril.

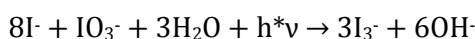
En los experimentos finales, se utilizó detergente neutro de espuma controlada WK-810 (compuesto por hidróxido de sodio menor al 1%) diluido 1:50 reemplazando el hidróxido de sodio 0,1% p/p y una vez a la semana se realizó un lavado con detergente alcalino con

espuma controlada WK-790 (hidróxido de sodio 9 - 12%) diluido 1:50 para evitar el daño en los electrodos de las lámparas UV-C.

### 5.6.2. Cálculo de las dosis germicidas UV-C

La dosis UV-C entregada se determinó usando la técnica de actinometría de Rhan (1997), siendo adaptada para un tratamiento de flujo continuo (Char et al., 2010). Las soluciones yoduro de potasio 0,6 M y yodato de potasio 0,1 M en buffer borato 0,01 M (pH = 9,25) se utilizaron como actinómetros químicos, las cuales fueron preparadas y mezcladas durante el día de la determinación. La luz UV-C provoca la generación de triyoduro cuando la solución es tratada en el sistema, el cual se cuantificó mediante la medición de absorbancia a 352 nm.

La ecuación general para el conjunto de reacciones de actinometría corresponde a:



Se aplicó la siguiente ecuación para el cálculo de rendimiento cuántico ( $\phi$ ) de las soluciones de yoduro y yodato de potasio utilizadas en esta técnica, que incorporan la temperatura (T) y la concentración de yoduro de potasio (C):

$$\phi = 0,75[1 + 0,02(T - 20,7)][1 + 0,23(C - 0,577)]$$

La absorbancia de la solución de yoduro y yodato se midió a 300 y 352 nm antes de ser expuesta a luz UV-C. La lectura a 300 nm permitió calcular la concentración de yoduro en la solución actinométrica según la ecuación:

$$[Yoduro] (M) = \frac{1,061}{OD (300 \text{ nm})}$$

Luego la muestra se trató con luz UV-C y se registró la temperatura. Se calculó el rendimiento cuántico corregido que expresa la cantidad de Einsteins de fotones absorbidos por la muestra según la siguiente ecuación, donde se utilizó el aumento en la absorbancia a 352 nm ( $\Delta OD_{352 \text{ nm}}$ ), el coeficiente de extinción molar de triyoduro ( $26400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y volumen de la muestra tratada (L):

$$E \left( \frac{\text{Einsteins}}{L} \right) = \frac{[\Delta OD_{352 \text{ nm}} * 26400 * Vol (L)]}{\phi}$$

El número de fotones incidentes fueron transformados en kilojulios/m<sup>2</sup>.

Se aplicó la luz UV-C con tiempos de exposición de 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 y 20 min. Durante cada tratamiento, se tomaron muestras del estanque de almacenamiento con la bebida

inoculada a intervalos de tiempo seleccionados y se analizaron para la enumeración de los supervivientes. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **5.7. Tratamiento combinado de vainillina y UV-C**

Se adicionó vainillina (0,1% p/v) preparada en solución etanol:agua (40:60) a las bebidas proteicas según los resultados previos de Char et al., (2010). Se aplicaron dosis UV-C con los mismos tiempos de exposición que en el ensayo de tratamiento UV-C individual. Posteriormente se tomaron muestras a los intervalos de tiempo definidos y se colocaron en hielo hasta su enumeración. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

### **5.8. Enumeración bacteriana**

Se analizó el recuento de supervivientes al tratamiento UV-C o UV-C combinado con vainillina, realizando diluciones seriadas de las muestras en agua de peptona 0,1% p/v y se sembraron en superficie 100 µL de suspensión de muestra por duplicado, usando TSA-YE para los ensayos con *E. coli* y *L. innocua*. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h (*E. coli*) y 48 h (*L. innocua*). Los ensayos se replicaron al menos tres veces y se informó la fracción de microorganismos supervivientes promedio. Las curvas de supervivencia se generaron a partir de los datos experimentales trazando  $\text{Log } N/N_0$  (donde  $N$  es el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL en un momento dado y  $N_0$  el número inicial de UFC/mL) frente al tiempo de tratamiento.

### **5.9. Modelo de distribución de resistencias de Weibull**

Las curvas de supervivencia de las bacterias se ajustaron a la forma acumulativa de una distribución de resistencias tipo Weibull (Peleg & Cole, 2000), con el fin de calcular los parámetros de inactivación y seleccionar los tratamientos más adecuados según la siguiente ecuación:

$$S(t) = \text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -b \times t^n$$

Donde  $S$  es la fracción de supervivencia del microorganismo,  $t$  es el tiempo de reacción,  $b$  y  $n$  son constantes que fueron obtenidas utilizando una técnica de regresión no lineal y representan el grado de inactivación de las células microbianas ( $b$ ) y el parámetro de forma

o tendencia de la curva de supervivencia ( $n$ ). Posteriormente, se usaron los valores de  $b$  y  $n$  para generar las curvas de frecuencia de resistencias usando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1} \exp(-bt_c^n)$$

donde  $t_c$  es una medida de la resistencia o sensibilidad del organismo y  $\frac{d\phi}{dt_c}$  es la distribución de Weibull correspondiente a  $t_c$ . Además, se calcularon los parámetros estadísticos moda de distribución  $t_{cm}$  correspondiente al tiempo de tratamiento en el que la mayoría de la población muere o se inactiva; media  $\bar{t}_c$  que representa el tiempo de inactivación promedio, con su varianza  $\sigma_{tc}^2$ ; y coeficiente de sesgo  $v_1$ , que indica el sesgo de la distribución. Estos parámetros se obtuvieron a partir de las siguientes ecuaciones:

$$t_{cm} = \left[ \frac{(n-1)}{nb} \right]^{1/n}$$

$$\bar{t}_c = \frac{\left\{ \Gamma \left[ \frac{n+1}{n} \right] \right\}}{b^{1/n}}$$

$$\sigma_{tc}^2 = \frac{\left\{ \Gamma \left[ \frac{(n+2)}{n} \right] - \Gamma \left[ \frac{(n+1)}{n} \right]^2 \right\}}{b^{2/n}}$$

$$v_1 = \frac{\left[ \Gamma \left( n + \frac{3}{n} \right) / b^{3/n} \right]}{\left[ \Gamma \left( n + \frac{3}{n} \right) / b^{2/n} \right]^{3/2}}$$

### 5.10. Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de comparación de medias de Tuckey para analizar si hay diferencias significativas entre los parámetros físicos y químicos de las bebidas ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, se utilizó el software STATGRAPHICS Centurion XVI.I para Windows (Statistical Graphics Corp., Washington, EE. UU.) para los análisis de regresión no lineal.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Caracterización fisicoquímica de las bebidas proteicas

En primer lugar, las diferentes formulaciones de bebidas proteicas ensayadas fueron caracterizadas mediante parámetros físicos y químicos como pH, sólidos solubles, acidez titulable, coeficiente de absortividad, color y viscosidad (Tabla 2). Para todas las propiedades medidas existen diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de bebidas proteicas ( $p < 0,05$ ), excepto para viscosidad observándose una diferencia significativa entre Bebida A y B y la Bebida C. Las tres bebidas exhiben pH ácido, sin embargo, a la bebida C se le adicionó ácido cítrico para alcanzar un pH de 4,5. Respecto a los sólidos solubles, la Bebida A es la que presenta mayor cantidad de sólidos solubles que se relaciona a la mayor proporción de jugo de manzana que tiene esta formulación, además tiene la mayor acidez titulable, coeficiente de absortividad y viscosidad en comparación a las otras bebidas. Por otro lado, la Bebida C es la formulación que presenta menor °Brix, acidez titulable y coeficiente de absortividad, mientras que la bebida B presenta valores intermedios de estas propiedades.

Las propiedades ópticas de los alimentos como el coeficiente de absortividad molar, turbidez y color son factores significativos que afectan la eficiencia de inactivación del proceso UV. Específicamente, el coeficiente de absortividad es una propiedad medida de la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración, absorbancia o densidad óptica. Cuanto mayor sea la concentración de una sustancia, mayor será su absorbancia debido a que la proporción de luz que se absorbe se ve afectada por la cantidad de moléculas con las que interactúa, que resulta en una baja penetración de la luz UV. En una solución diluida, la absorbancia es baja porque hay menos moléculas disponibles para interactuar con la luz (Koutchma et al., 2021). Todas las bebidas ensayadas contienen una misma cantidad de WPC por lo tanto la proporción de jugo de manzana es la principal variable que determina el coeficiente de absortividad medido. La Bebida A es la bebida que presenta mayor proporción de jugo de manzana y por ende un mayor coeficiente de absortividad que se relaciona a una menor eficiencia de desinfección UV. En cuanto al color, se observó un aumento del parámetro  $L^*$  (luminosidad) al disminuir el porcentaje de jugo de manzana, mientras que los valores  $a^*$  (componente rojo) y  $b^*$  (componente amarillo) disminuyeron (Tabla 2).

**Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de bebidas proteicas.**

Formulación	Suspensión de proteína de suero (P)	Jugo de manzana (JM)	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez titulable (g/mL ácido málico)	Coefficiente de absorptividad (cm <sup>-1</sup> )	Viscosidad (cP)	L*	a*	b*
Bebida A	60%	40%	4,75 ± 0,009 <sup>a</sup>	7,47 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,184 ± 0,002 <sup>a</sup>	49,59 ± 0,25 <sup>a</sup>	7,28 ± 0,08 <sup>a</sup>	71,39 ± 0,02 <sup>a</sup>	-1,63 ± 0,07 <sup>a</sup>	19,05 ± 0,08 <sup>a</sup>
Bebida B	70%	30%	4,96 ± 0,003 <sup>b</sup>	6,47 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,152 ± 0,002 <sup>b</sup>	48,41 ± 0,32 <sup>b</sup>	7,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	72,36 ± 0,03 <sup>b</sup>	-2,36 ± 0,03 <sup>b</sup>	16,17 ± 0,13 <sup>b</sup>
Bebida C	80%	20%	5,08 ± 0,006 <sup>c</sup>	5,13 ± 0,17 <sup>c</sup>	0,129 ± 0,000 <sup>c</sup>	46,89 ± 0,08 <sup>c</sup>	6,86 ± 0,10 <sup>b</sup>	73,49 ± 0,02 <sup>c</sup>	-3,17 ± 0,04 <sup>c</sup>	12,76 ± 0,03 <sup>c</sup>

Valores medios de pH, sólidos solubles (°Brix), acidez titulable (g/mL ácido málico), coeficiente de absorptividad a 254 nm, viscosidad (cP) y parámetros de color CIELab (L\*, a\*, b\*) junto con los errores estándar correspondientes de las formulaciones de bebidas utilizadas en este estudio (n = 3). Los valores de columna con diferentes letras (a, b, c) presentan diferencias significativas (p < 0,05).

## 6.2. Determinación de la dosis germicida UV-C

Para determinar las dosis UV-C administradas durante el procesamiento, se aplicó una reacción actinométrica utilizando una solución de yoduro 0,6 M y yodato 0,1 M en buffer borato 0,01 M como actinómetro químico. La exposición de esta solución a la luz UV-C durante diferentes tiempos resultó en la formación de distintas concentraciones de triyoduro que fue cuantificado por su absorbancia a 352 nm. De esta manera, se calcularon las dosis UV-C correspondientes a cada tiempo de procesamiento.

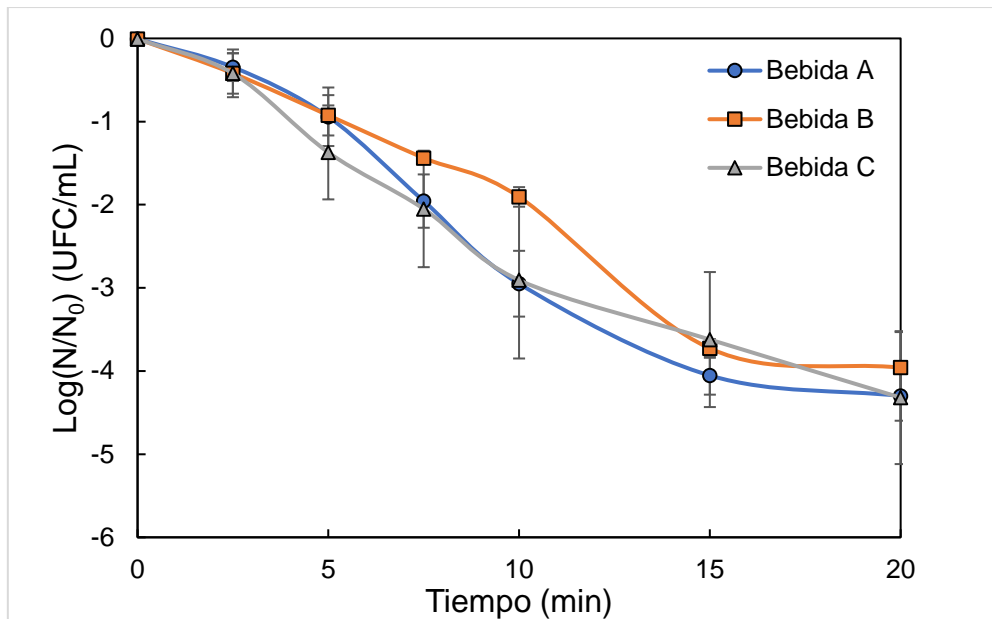
**Tabla 3. Cálculo de dosis UV-C aplicadas en relación al tiempo de procesamiento.**

Tiempo (min)	Dosis UV-C (kJ/m <sup>2</sup> )
0	0,04
2,5	9,13
5	9,92
7,5	18,61
10	24,02
15	35,85
20	47,72

## 6.3. Efecto de luz UV-C en la inactivación de *E. coli* en las bebidas proteicas

Para estudiar el efecto germicida de la luz UV-C, las bebidas proteicas fueron inoculadas con *E. coli* y se analizó el número de supervivientes de las muestras tratadas con luz UV-C (0 - 20 min). En la Figura 2 se observan las curvas de inactivación de *E. coli* por luz UV-C en las diferentes formulaciones de bebidas proteicas. El tratamiento UV-C provocó reducciones entre 3,95 y 4,31 log UFC/mL de *E. coli* en las bebidas proteicas. La luz UV-C fue más efectiva en la Bebida C donde se registró una inactivación de aproximadamente 2,90 log UFC/mL a los 10 min de tratamiento y 4,31 log UFC/mL los 20 min de tratamiento. La Bebida B, a pesar de presentar un valor intermedio de coeficiente de absortividad ( $\alpha = 26,08 \text{ cm}^{-1}$ ) en comparación a las otras formulaciones, presentó los menores niveles de inactivación (3,95 log UFC/mL a los 20 min de luz UV-C).

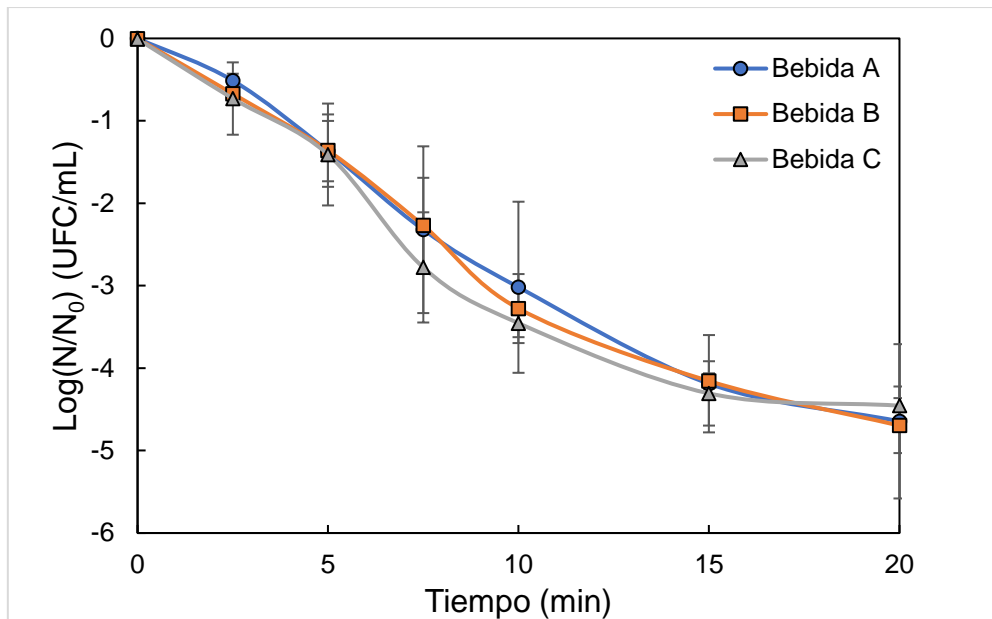




**Figura 2. Inactivación de *E. coli* por luz UV-C en bebidas proteicas.** Curvas de supervivencia de *E. coli* al tratamiento con luz UV-C en las bebidas proteicas.

#### 6.4. Efecto de luz UV-C en la inactivación de *L. innocua* en las bebidas proteicas

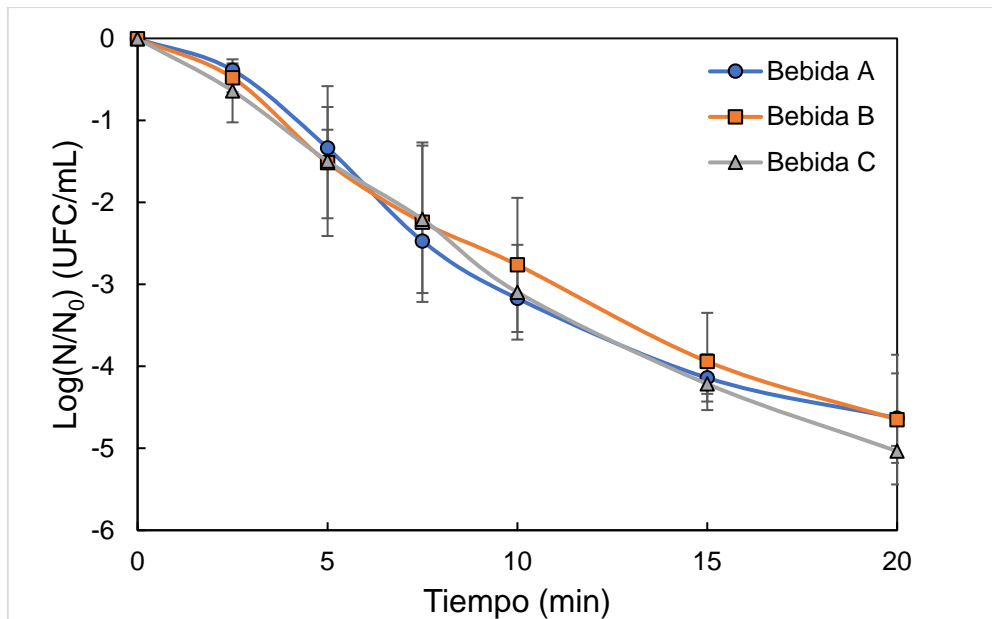
Las curvas de supervivencia de *L. innocua* tratadas por luz UV-C en las bebidas proteicas están presentadas en la Figura 3, observándose una tendencia similar en la inactivación del microorganismo en las diferentes formulaciones de bebidas. Se alcanzaron reducciones logarítmicas entre 4,45 y 4,69 de *L. innocua* al tratar las bebidas proteicas con 20 min de luz UV-C, siendo más efectiva en la Bebida B. Sin embargo, se observaron niveles de inactivación de 3,01, 3,27 y 3,45 log UFC/mL a los 10 min de tratamiento UV en las Bebidas A, B y C respectivamente. Demostrando que existe una disminución más rápida de *L. innocua* en la Bebida C durante los primeros 10 min de aplicación de luz UV-C en comparación a las otras formulaciones de bebidas proteicas.



**Figura 3. Inactivación de *L. innocua* por luz UV-C en bebidas proteicas.** Curvas de supervivencia de *L. innocua* por tratamiento UV-C en las bebidas proteicas.

### 6.5. Efecto combinado de luz UV-C y vainillina en la inactivación de *E. coli* en las bebidas proteicas

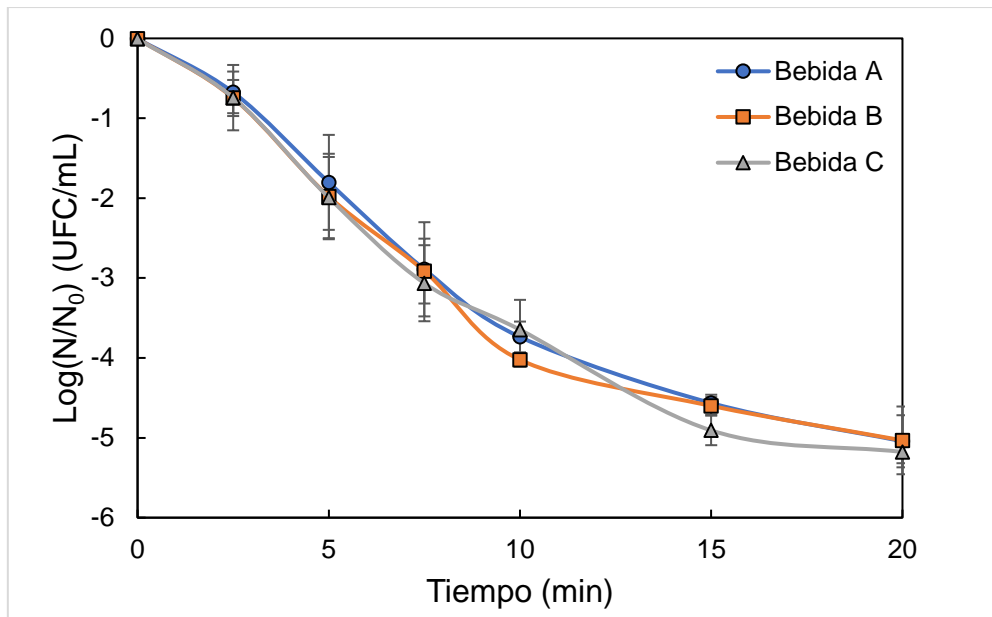
Para determinar la efectividad de la tecnología de obstáculos en la inactivación microbiana, las bebidas proteicas inoculadas con *E. coli* fueron tratadas con luz UV-C y antimicrobiano vainillina (0,1% p/v) y luego se determinó el número de supervivientes (Figura 4). El tratamiento combinado fue más efectivo en la Bebida C, donde redujo *E. coli* en 5,03 log UFC/mL en 20 min, en comparación a la disminución de 4,31 log UFC/mL observada en la misma bebida tratada solo con luz UV-C.



**Figura 4. Inactivación de *E. coli* por la combinación de luz UV-C y vainillina en bebidas proteicas.** Curvas de supervivencia de *E. coli* por tratamiento combinado de UV-C y vainillina (0,1% p/v) en las bebidas proteicas.

#### 6.6. Efecto combinado de luz UV-C y vainillina en la inactivación de *L. innocua* en las bebidas proteicas

En la Figura 5 se observa la inactivación de *L. innocua* por la combinación de luz UV-C y vainillina (0,1% p/v) en las formulaciones de bebidas proteicas, logrando mayores niveles de inactivación que en las bebidas inoculadas con *E. coli*. El procesamiento UV y vainillina alcanzaron reducciones de entre 5,03 y 5,17 log UFC/mL de *L. innocua* en las bebidas proteicas. El tratamiento combinado resultó más efectivo en la Bebida C donde la adición de vainillina consiguió un aumento en la inactivación de 0,72 log UFC/mL en comparación con la Bebida C tratada sólo con UV.



**Figura 5. Inactivación de *L. innocua* por luz UV-C y vainillina en bebidas proteicas.** Curvas de supervivencia de *L. innocua* por tratamiento combinado de UV-C y vainillina (0,1% p/v) en las bebidas proteicas.

A pesar de que en la formulación C se observaron las mayores reducciones logarítmicas tanto para *E. coli* como de *L. innocua* en el tratamiento combinado de luz UV-C y vainillina, no fue posible demostrar una relación entre la formulación de la bebida y la eficiencia de inactivación UV ya que no se encontraron diferencias marcadas entre los 3 tipos de bebidas proteicas y los niveles de inactivación microbiana alcanzados. Con el fin de obtener una mejor explicación de estos resultados, se ajustaron los datos de inactivación obtenidos al modelo matemático de Weibull para poder cuantificar así la respuesta microbiana frente a los diferentes tratamientos.

### 6.7. Aplicación del modelo de Weibull a las curvas de supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas

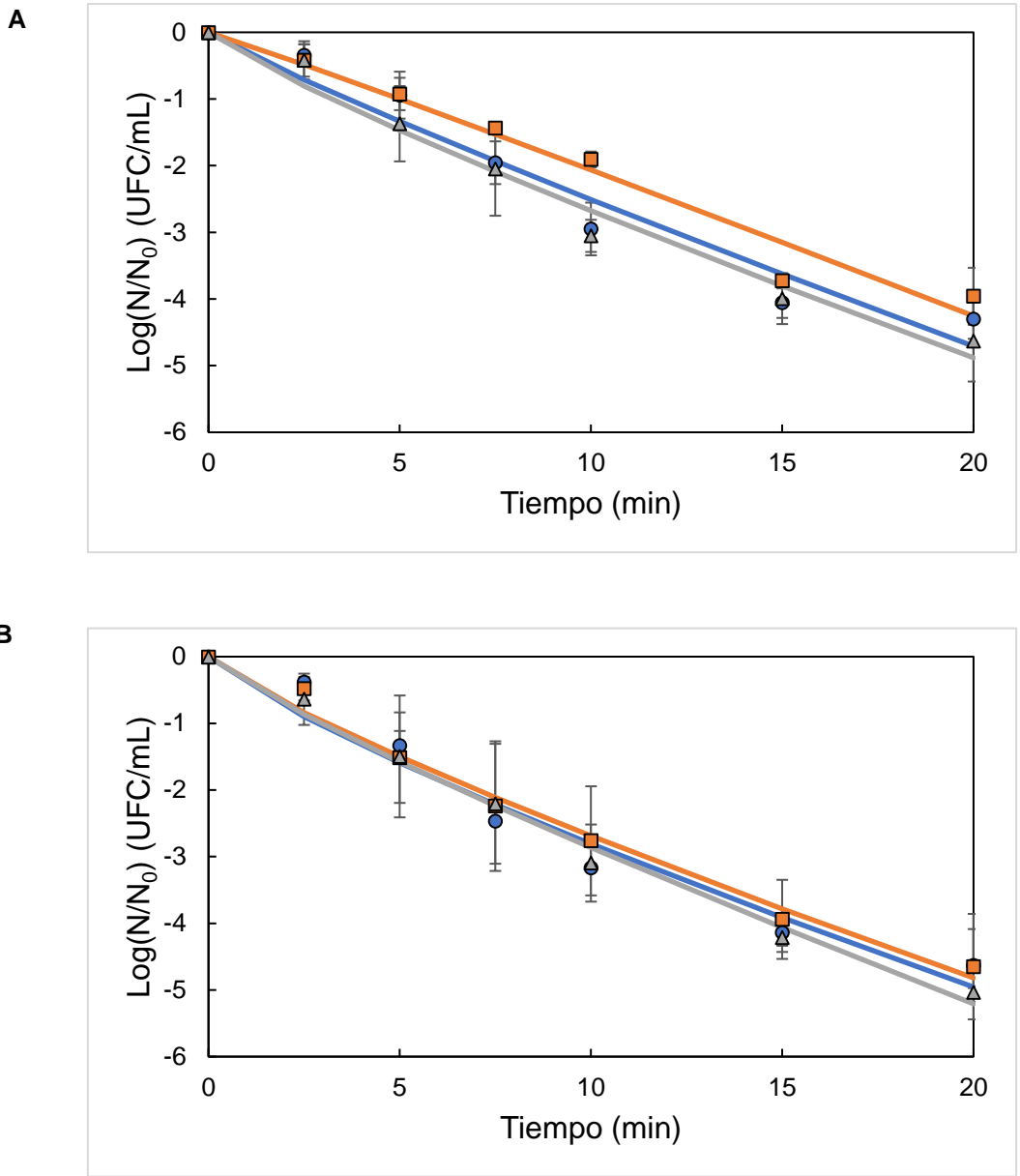
Las diferencias observadas entre los tratamientos fueron analizadas mediante el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull que surge como una alternativa a los modelos cinéticos considerando que existe un espectro de resistencias a un tratamiento determinado en la población bacteriana (Peleg & Cole, 1998). En las Figuras 6 y 7 se muestra el ajuste del modelo de distribución de Weibull a los datos experimentales, y en la Tabla 4, se presentan los parámetros  $b$  y  $n$  obtenidos al ajustar el modelo a las curvas de supervivencia de *E. coli*, obteniéndose altos valores de  $R^2$  entre 94,5% y 99,0%.

Los parámetros  $b$  y  $n$  variaron de acuerdo a la formulación de la bebida y al tratamiento combinado o no. El parámetro  $b$  corresponde al grado de inactivación microbiana. En el caso de *E. coli*, este valor  $b$  fue mayor en la Bebida C (bebida con 20% de jugo) entre las formulaciones tratadas con UV, como también lo demuestra la mayor inactivación de la curva modelada (Figura 6.a). La adición de vainillina en todas las formulaciones de bebidas proteicas provocó un aumento del valor de  $b$  respecto a la misma bebida tratada solo con UV, es decir, consiguió un mayor efecto inhibitorio de *E. coli*. Sin embargo, en los tratamientos combinados de UV y vainillina, el grado de inactivación (parámetro  $b$ ) estuvo en el rango entre 0,39 y 0,42 con escasa diferencia entre las distintas bebidas (Figura 6, Tabla 4).

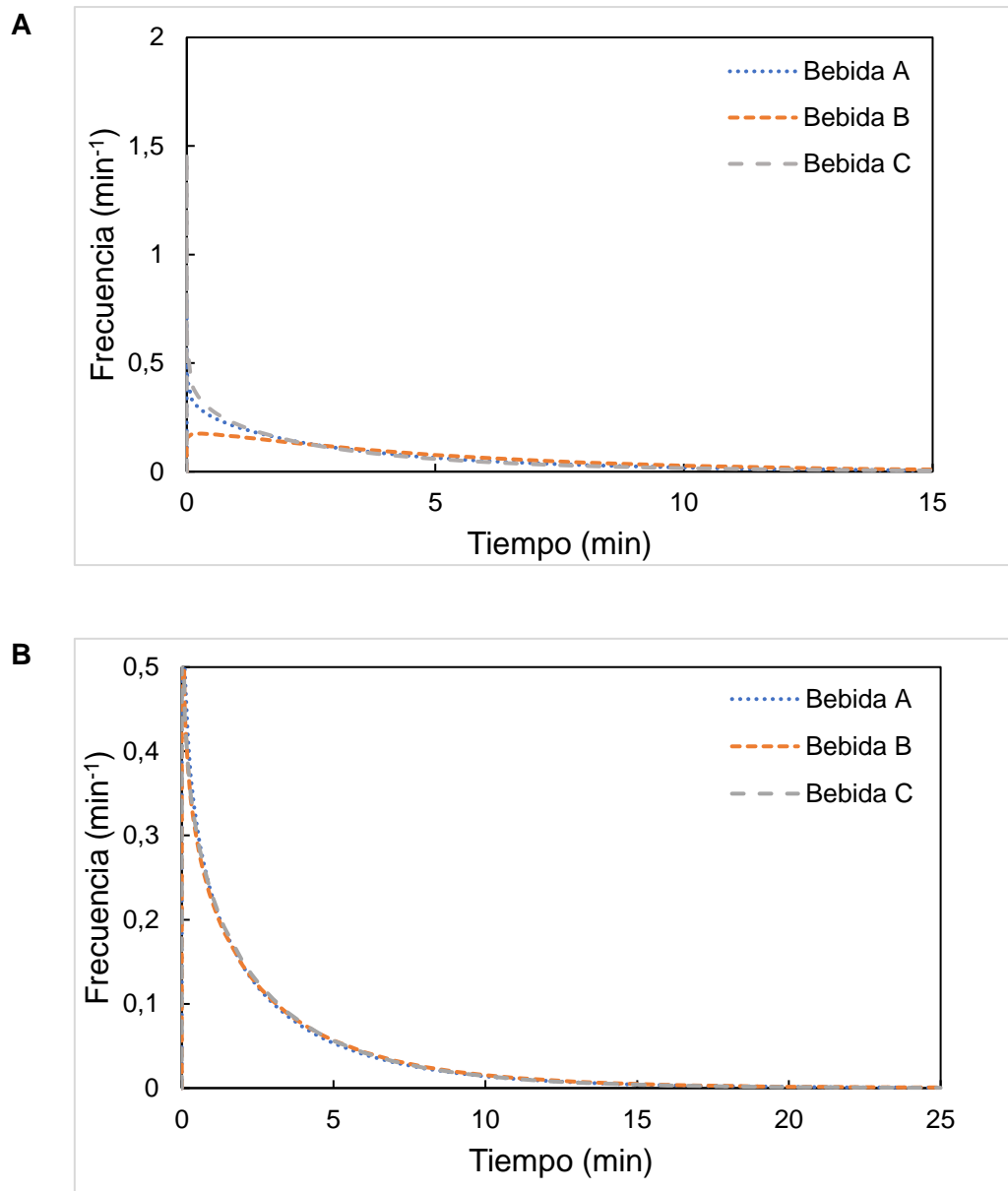
Por otro lado, el parámetro  $n$  está relacionado con la forma de la curva de inactivación. Si  $n = 1$  la curva de supervivencia resultará lineal en las coordenadas semilogarítmicas correspondiendo a una cinética de primer orden. Cuando  $n < 1$ , la curva de supervivencia muestra gran inactivación desde el comienzo del tratamiento con una concavidad hacia arriba. En cambio, cuando  $n > 1$ , la curva de supervivencia semilogarítmica muestra un hombro inicial y una concavidad hacia abajo pronunciada (Peleg & Cole, 1998).

Las Bebidas A y C obtuvieron un valor de  $n$  similar, mientras que solo la Bebida B tratada con UV tiene curvas de supervivencia con  $n = 1$  casi lineal. Tanto las muestras procesadas con UV-C como las UV + vainillina obtuvieron valores de  $n < 1$  que se vincula a una fuerte inactivación desde el comienzo del tratamiento, lo que indicaría gran sensibilidad de los microorganismos al tratamiento UV-C por la acumulación de daños y se asocia a una concavidad ascendente de la curva de supervivencia (Figura 6).

Posteriormente se utilizaron los valores de  $b$  y  $n$  para generar los gráficos de distribución de frecuencias de resistencias (Figura 7) y estadísticos asociados como moda, media, varianza y coeficiente de sesgo presentados en la Tabla 4. Al comparar las bebidas tratadas con UV-C, la Bebida C presentó el mayor grado de inactivación ( $b$ ) y curvas más estrechas con un importante sesgo a la derecha. Que se relacionó además con una mayor moda y los menores valores de media y varianza respecto a las Bebidas A y B. Lo que demuestra que, en esta bebida, la mayoría de la población de *E. coli* fue más sensible al UV-C en cortos tiempos de exposición. Además, el tratamiento UV combinado con vainillina 0,1% p/v en todas las bebidas produjo curvas más estrechas con mayor moda y con una marcada reducción en la dispersión (menor media y varianza), comparados con las bebidas tratadas sólo con UV-C (Figura 7).



**Figura 6. Ajuste del modelo de Weibull a los datos de supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina.** Valores experimentales (puntos) y predichos (líneas). (●) Bebida A; (■) Bebida B; (▲) Bebida C. **A:** Bebidas tratada con UV; **B:** Bebidas tratadas con UV y vainillina 0,1% p/v.



**Figura 7.** Distribución de frecuencias de resistencias correspondientes a las curvas de supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina ajustadas con la función de distribución acumulativa de Weibull. **A:** Bebidas tratada con UV; **B:** Bebidas tratadas con UV y vainillina 0,1% p/v.

**Tabla 4. Parámetros de distribución tipo Weibull (*b* y *n*) y estadísticas relacionadas correspondientes a la supervivencia de *E. coli* en las bebidas proteicas tratadas con luz UV-C con o sin vainillina (0,1% p/v).**

<b>Bebida</b>	<b>Tratamiento</b>	<b><i>b</i></b>	<b>SE</b>	<b><i>n</i></b>	<b>SE</b>	<b>Variabilidad explicada % (R<sup>2</sup>adj)</b>	<b>Moda (min)</b>	<b>Media (min)</b>	<b>Varianza (min<sup>2</sup>)</b>	<b>Coficiente de sesgo</b>
<b>A</b>	UV	0,31	0,12	0,91	0,14	94,5	0,29	3,81	17,58	2,35
<b>A</b>	UV + V	0,42	0,13	0,82	0,14	94,5	0,45	3,16	15,07	2,65
<b>B</b>	UV	0,19	0,07	1,04	0,13	96,1	0,24	4,91	22,14	2,03
<b>B</b>	UV + V	0,39	0,07	0,84	0,06	98,6	0,42	3,38	16,29	2,57
<b>C</b>	UV	0,36	0,09	0,87	0,09	97,4	0,37	3,45	15,96	2,48
<b>C</b>	UV + V	0,39	0,06	0,86	0,05	99,0	0,35	3,18	13,72	2,49



## 6.8. Análisis de Weibull de la inactivación de *L. innocua* en las bebidas proteicas

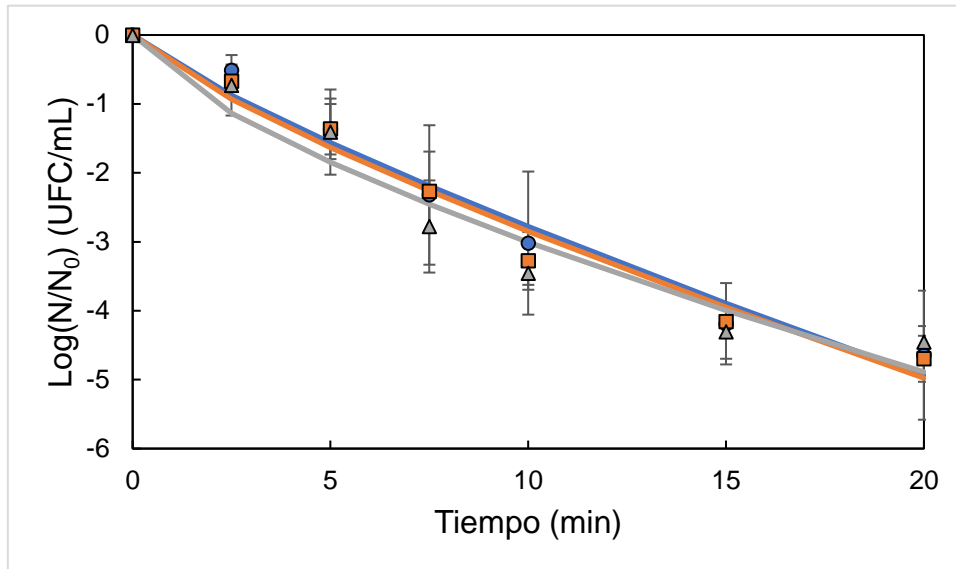
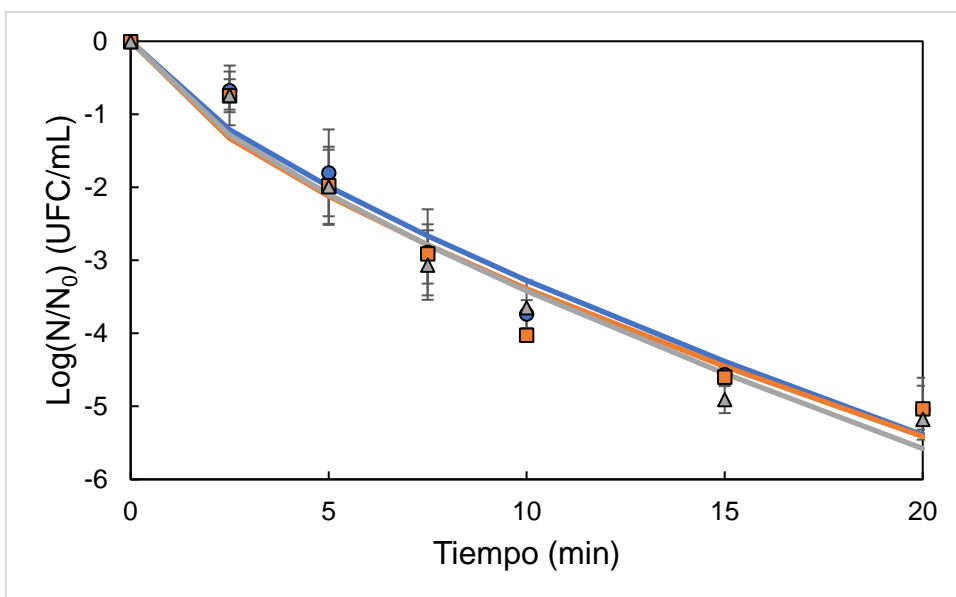
Los parámetros  $b$  y  $n$  también fueron calculados para la inactivación de *L. innocua* en bebidas proteicas (Tabla 5). El modelo Weibull resultó apropiado para representar los datos de supervivencia como se observa en las Figuras 8 y 9, ya que se obtuvieron valores elevados de  $R^2$  entre 93,9% y 97,3%. Además, en la Tabla 5 se muestran los valores de  $b$  y  $n$  luego del ajuste del modelo a las curvas de inactivación de *L. innocua*.

En el caso de las bebidas proteicas tratadas con UV-C, se observó que el parámetro  $b$  fue más alto en la formulación C ( $b = 0,60$ ) en comparación a las bebidas A y B. La bebida C presenta un 20% de jugo de manzana y el menor coeficiente de absorptividad ( $\alpha = 46,89 \text{ cm}^{-1}$ ), que se relaciona a una menor eficiencia de desinfección debido a una mejor transmisión de la luz UV en el líquido. A su vez, la bebida B presentó un valor  $b$  de 0,45 mayor al de la bebida A ( $b = 0,41$ ). Por lo tanto, se observa claramente que el parámetro  $b$  sigue la siguiente tendencia en las bebidas:  $C > B > A$  (Tabla 5). En todos los tratamientos combinados de UV y vainillina, se observó un aumento del valor de  $b$  en todas las formulaciones en comparación a las mismas bebidas tratadas con UV por sí solo. La adición de vainillina, por consiguiente, mejoró el efecto antimicrobiano de la luz UV-C en las bebidas proteicas. El rango de inactivación (parámetro  $b$ ) de *L. innocua* en las bebidas tratadas UV y vainillina estuvo entre 0,63 y 0,71, siendo mayor y la diferencia más acentuada entre las bebidas respecto a las curvas de *E. coli* con el mismo tratamiento ( $b = 0,39 - 0,42$ ). En todas estas bebidas, se alcanzó una reducción igual a 5 log UFC/mL de *L. innocua* que es exigido por la FDA como tratamiento alternativo a la pasteurización térmica (Figura 5).

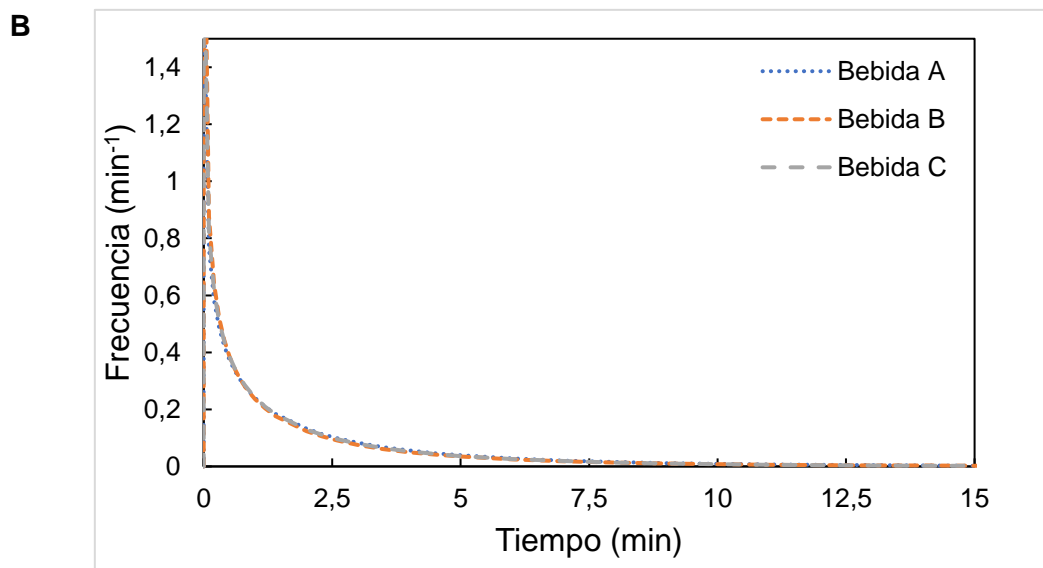
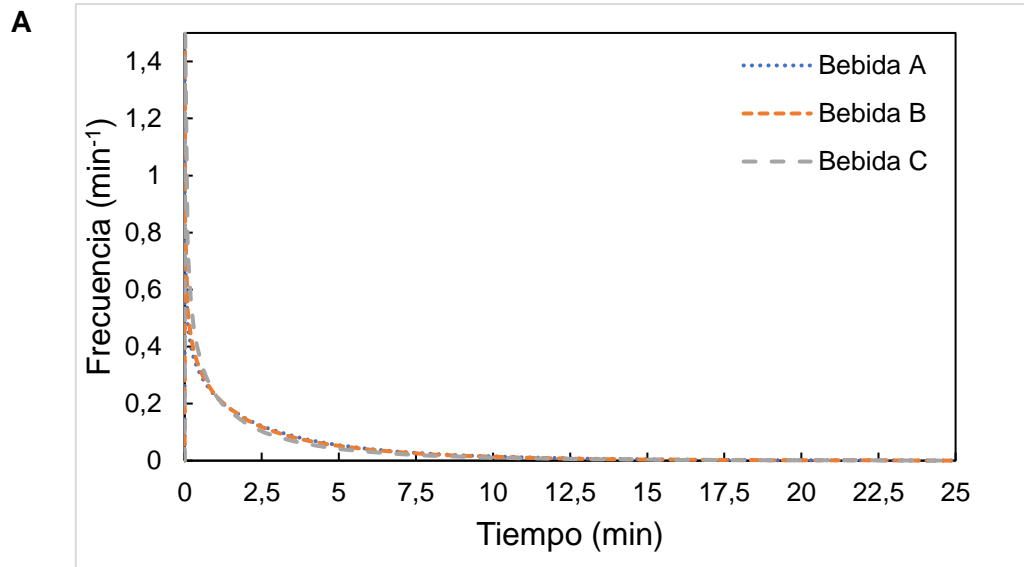
En el caso de *L. innocua* todas las curvas de inactivación, tanto las muestras procesadas con UV-C como los tratamientos combinados, exhibieron valores de  $n < 1$  que se vincula a una concavidad ascendente de la curva de supervivencia, lo que indicaría una mayor sensibilidad de este microorganismo frente a los tratamientos en comparación con *E. coli* (Figura 8). Los valores de  $n$  en *E. coli* variaron de 0,82 y 1,04, mientras que este parámetro para *L. innocua* tuvo valores entre 0,68 y 0,83. En las formulaciones A y B tratadas con UV y vainillina, se observó además una disminución del valor de  $n$  respecto a las bebidas tratadas con UV que se relaciona a una mayor inactivación microbiana.

Los valores de  $b$  y  $n$  se usaron para generar los gráficos de distribución de frecuencia (Figura 9) y estadísticos asociados como moda, media, varianza y coeficiente de sesgo presentados en la Tabla 5. Las distribuciones de frecuencias de resistencias de los tratamientos UV-C exhibieron una mayor moda, con menor dispersión y menores valores de media y varianza en comparación a los resultados obtenidos para *E. coli* (Figura 9). Al igual que en los datos de inactivación de *E. coli*, la Bebida C tratada con UV-C presentó el mayor grado de

inactivación (*b*) y curvas más estrechas con un importante sesgo a la derecha respecto a las formulaciones A y B con el mismo tratamiento. Esto se vinculó a una mayor moda y los menores valores de media y varianza respecto a las Bebidas A y B. En todas las bebidas, el tratamiento combinado con vainillina 0,1% p/v produjo un mayor estrechamiento de las curvas de frecuencia, con mayor moda y una reducción en la dispersión (menor media y varianza) comparados con las bebidas tratadas con UV solo (Tabla 5). Lo que indica que la mayoría de la población de *L. innocua* fue más sensible al tratamiento combinado en cortos tiempos de exposición en comparación al tratamiento único de UV.

**A****B**

**Figura 8. Ajuste del modelo de Weibull a los datos de supervivencia de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina. Valores experimentales (puntos) y predichos (líneas). (●) Bebida A; (■) Bebida B; (▲) Bebida C. **A:** Bebidas tratada con UV; **B:** Bebidas tratadas con UV y vainillina 0,1% p/v.**



**Figura 9. Distribución de frecuencias de resistencias correspondientes a las curvas de supervivencia de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con UV-C con o sin vainillina ajustadas con la función de distribución acumulativa de Weibull. A: Bebidas tratada con UV; B: Bebidas tratadas con UV y vainillina 0,1% p/v.**

**Tabla 5. Parámetros de distribución tipo Weibull (*b* y *n*) y estadísticas relacionadas correspondientes a la supervivencia de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con luz UV-C con o sin vainillina (0,1% p/v).**

<b>Bebida</b>	<b>Tratamiento</b>	<b><i>b</i></b>	<b>SE</b>	<b><i>n</i></b>	<b>SE</b>	<b>Variabilidad explicada % (R<sup>2</sup>adj)</b>	<b>Moda (min)</b>	<b>Media (min)</b>	<b>Varianza (min<sup>2</sup>)</b>	<b>Coficiente de sesgo</b>
<b>A</b>	UV	0,41	0,10	0,83	0,09	97,3	0,43	3,23	15,24	2,61
<b>A</b>	UV + V	0,63	0,16	0,72	0,09	96,0	0,52	2,37	11,31	3,18
<b>B</b>	UV	0,45	0,10	0,81	0,09	97,2	0,47	3,07	14,81	2,71
<b>B</b>	UV + V	0,71	0,19	0,68	0,10	95,0	0,55	2,15	10,76	3,49
<b>C</b>	UV	0,60	0,18	0,70	0,12	93,9	0,62	2,63	14,73	3,29
<b>C</b>	UV + V	0,67	0,16	0,71	0,09	96,3	0,51	2,20	10,15	3,26

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Formulación de bebida proteica

En esta tesis se utilizó una innovadora formulación de bebida láctea a base de proteína de suero de leche, jugo de manzana, endulzante natural, con o sin adición de vainillina. Las diferentes formulaciones de bebidas proteicas de este estudio contienen 30 g/L de proteína con pH ácido entre 4,75 y 5,08 de color amarillo-blanco y agradable aroma a manzana. Este es un producto nuevo que no existe actualmente en la categoría de lácteos o bebidas del mercado chileno. No obstante, existen algunos productos similares en formulación en el mercado entre los cuales se encuentra el Agua Pro12 de la marca Colun®, la cual contiene 12 g de proteína en 330 mL (alrededor de 36 g/L de proteína) y es elaborada a partir de WPI, con adición de azúcar y edulcorante natural pero solo es saborizada (naranja o lima/limón) a diferencia de nuestra formulación que contiene jugo de fruta. Otras opciones en el mercado es el Batido proteico SHAKE&GO de Wild Protein® con sabor a vainilla, chocolate, frutilla o café (45 g/L de proteína, formato de 330 mL), producida con leche entera en polvo, suero de leche en polvo y endulzantes sin adición de azúcar. Los formatos más tradicionales incluyen leche con un alto contenido de proteína de hasta 80 g/L como la Leche Full Pro Chocolate de Loncoleche® comercializado en una porción de 250 mL, que es elaborada con leche fluida descremada, concentrado de proteína de leche, cacao y endulzantes.

A nivel mundial, las bebidas lácteas ricas en proteínas (incluidas las proteínas en polvo para aplicaciones listas para mezclar) están en aumento, con una tasa de crecimiento anual promedio de lanzamiento de nuevos productos del 20,8% entre 2016 y 2021 (Innova Market Insights, 2021). Las bebidas proteicas están dirigidas para el consumo entre atletas y personas aficionadas al deporte y para personas mayores y jubilados. En EE.UU., existe una amplia variedad de bebidas listas para tomar (RTD) a base de proteínas de la leche con ingredientes como WPC, WPI, concentrado de proteína de leche (MPC), aislado de proteína de leche, caseinato de calcio, aislado de proteína de soya, entre otros. Estas bebidas contienen en promedio una cantidad de 40 y 100 gramos de proteína por litro, una cantidad mayor a las formulaciones de bebidas proteicas de esta tesis, en porciones de entre 90 hasta 500 mL (Singh et al., 2022).

La elección de los ingredientes de proteína láctea puede influir en las propiedades sensoriales de la bebida final. Vogel et al. (2021), estudiaron el papel de la concentración de proteína y el tipo de ingrediente de proteína de leche sobre las propiedades sensoriales de las bebidas proteicas con vainilla RTD. Para ello, utilizaron WPI, concentrado de caseína micelar (MCC) y MPC. Las bebidas proteicas RTD se fabricaron a partir de 5 mezclas de proteínas de leche líquida diferentes: 100% MCC, 100% MPC, 18:82 WPI:MCC, 50:50 SPI:MCC y 50:50

SPI:MPC, en 2 concentraciones de proteína diferentes: 6,3% y 10,5% p/p de proteína con 0,5% p/p de grasa y 0,7% p/p de lactosa. Es decir, estos autores utilizaron 15 o 25 g de proteína por 237 mL, lo que equivale a 2 y 3,5 veces la cantidad de proteína ocupada en esta tesis. Las bebidas mezcladas se precalentaron a 60°C, se homogeneizaron con presión y se enfriaron a 8°C. Luego, las bebidas se precalentaron a 90°C y se ultrapasteurizaron (141°C, 3 s) mediante inyección directa de vapor, seguidas de enfriamiento al vacío a 86°C y se homogeneizaron nuevamente. Este tratamiento con pasteurización térmica podría haber inducido cambios sensoriales en la bebida por el aumento de la desnaturalización de las proteínas del suero, a diferencia de nuestras bebidas que fueron tratadas solo con luz UV-C. Las propiedades sensoriales se evaluaron mediante un almacenamiento de 8 semanas a 4°C. La astringencia y la viscosidad sensorial fueron mayores y el sabor a vainillina fue menor en las bebidas que contenían 10,5% de proteína en comparación con el 6,3% de proteína. Mientras que el sabor a azufre/huevo, la astringencia y la viscosidad fueron mayores, y el sabor dulce aromático/vainillina fue menor en las bebidas con mayor contenido de proteína sérica como porcentaje de proteína total. Los sabores a azufre/huevos y aromáticos dulces/vainillina disminuyeron en todas las bebidas a durante el almacenamiento (Vogel et al., 2021).

En otro estudio, se probaron distintas formulaciones de bebidas proteicas basadas en un diseño de 3 factores (grasa, proteína verdadera y caseína) con 3 niveles de grasa (0,2 a 2,0%), 4 niveles de proteína (3,0 a 5,0%) dentro de cada nivel de grasa, y 5 niveles de caseína como porcentaje de los niveles de proteína verdadera con un total de 60 formulaciones. Se les aplicó ultrapasteurización a las bebidas proteicas con una temperatura 73°C por 15 s. Los resultados concuerdan con el análisis de Vogel et al. 2021, ya que a una mayor concentración de proteína sérica se generó una mayor intensidad de aroma, sabores aromáticos dulces, cocidos/azufrados, a cartón y puntajes sensoriales de amarillamiento en los distintos niveles de grasa. A una mayor concentración de caseína, se reportó una mayor viscosidad instrumental en las bebidas de proteína de leche. Además, la formulación de bebidas de proteína de leche a un nivel más alto de proteína real aumentó la astringencia independientemente del nivel de grasa (Cheng et al., 2019).

La adición de jugos y/o pulpas de frutas a bebidas proteicas aporta características deseables al producto, como compuestos aromáticos, mejorando el sabor y consecuentemente la aceptabilidad del producto. Cappato et. al (2018) formularon una bebida proteica con una base láctea del 60% (leche pasteurizada y suero dulce en proporciones 70:30% v/v) y 30% v/v de pulpa de acerola. Los autores también agregaron azúcar 9,9% p/p y goma xantan 0,1% p/p, ingredientes que aumentan viscosidad de la formulación mientras que en esta tesis solo utilizamos jugo de manzana en proporciones de 20 a 40% con endulzante natural. El mismo

grupo de investigadores probaron la misma formulación láctea, ocupando frambuesa al 30% v/v para procesamiento con calentamiento óhmico (Ferreira et al., 2019). Por otra parte, se desarrolló una bebida probiótica a partir de suero de leche y jugo de piña. Para ello, el suero fue preparado y se calentó a 85°C antes de mezclarlo con jugo de piña en diferentes proporciones de 80:20, 75:25, 70:30 y 65:35 de suero y jugo de piña respectivamente. La bebida en proporción de 35:65 obtuvo el puntaje más alto con puntuaciones medias en cuanto a color y aspecto, consistencia, sabor y aceptabilidad general de 7,93-7,81-8,37-8,93 respectivamente. El suero suplementado con un 10% de sacarosa se fermentó durante diferentes intervalos de tiempo con o sin la adición de jugo de piña. La puntuación fue más alta para el suero fermentado junto con jugo de piña durante 5 h con *Lactobacillus acidophilus* 1% con un promedio de 8,92 puntos. Se determinó que los principales descriptores que caracterizaron a este producto fueron la acidez y el dulzor, con un pH de 4,38 cercano a la acidez de la formulación 60:40 de nuestro estudio (Shukla, 2012).

Al formular bebidas lácteas, se tiene una amplia gama de opciones de ingredientes de proteínas a base de leche que difieren en precio, que es uno de los principales factores que influyen la decisión de compra. Adicionalmente, la comprensión del efecto de los diferentes ingredientes de proteínas de la leche en las características de textura y sabor podría usarse para guiar las decisiones de formulación de nuevas bebidas lácteas.

## **7.2. Efecto de la luz UV-C en las propiedades fisicoquímicas de alimentos líquidos**

Los efectos de la luz UV-C sobre la calidad y los parámetros nutricionales se han abordado en diferentes matrices líquidas. En jugo de manzana tratado con UV-C (100,47 kJ/L) no se observó un aumento significativo de  $\alpha$  (52,4  $\text{cm}^{-1}$  a 56,9  $\text{cm}^{-1}$ ) (Müller et al., 2014). Sin embargo, estos autores informaron un aumento significativo en el coeficiente de absorción a 254 nm en jugo de uva tratado con la misma dosis UV-C ( $p < 0,05$ ), parámetro que experimentó un cambio de 43,4 a 49,6  $\text{cm}^{-1}$ . El mismo efecto fue observado preliminarmente en la formulación C de nuestro estudio, donde el parámetro aumentó casi 2 veces luego del procesamiento UV en la bebida con o sin vainillina 0,1% p/v ( $n = 1$ ). Los coeficientes de absorción de los jugos ensayados por estos autores son similares al de las bebidas proteicas de esta tesis, los cuales tomaron valores entre 46,89  $\text{cm}^{-1}$  y 49,59  $\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo, el pH de las formulaciones proteicas fue mayor entre 4,75 y 5,08 en comparación al pH del jugo de manzana y uva de este estudio de 3,80 y 3,67, respectivamente. Adicionalmente, el estudio informó una disminución en la viscosidad en los jugos de manzana y uva tratados con UV-C debido al esfuerzo de corte del bombeo. También se observó una reducción de los valores  $L^*$  en los jugos de manzana y uva y, simultáneamente, aumentaron los valores  $a^*$  y  $b^*$  de ambos jugos (Müller et al., 2014). Estos resultados fueron asociados a



reacciones de pardeamiento, donde una alta cantidad de PPO activa catalizó la oxidación de las sustancias fenólicas. Además, la alta cantidad de oxígeno en el jugo inyectado por el bombeo y el tratamiento UV cíclico habrían estimulado la reacción de pardeamiento en los jugos de uva y manzana evaluados (Müller et al., 2014).

En jugo de limón-melón, el coeficiente de absorción de las muestras UV-C (2,461 J/mL) fue menor ( $\alpha = 11,12 \text{ cm}^{-1}$ ) en comparación a los jugos control ( $\alpha = 14,88 \text{ cm}^{-1}$ ) y el jugo tratado térmicamente (72°C por 71 s;  $\alpha = 14,94 \text{ cm}^{-1}$ ), que fue asociado a la posible destrucción de vitamina C por luz UV. No obstante, no hubo diferencias significativas entre el jugo control y tratado con UV-C en términos de pH y acidez titulable ( $p > 0,05$ ). En cuanto al color, no se reportaron cambios significativos en los parámetros  $a^*$  y  $L^*$  en los jugos con el tratamiento UV-C, en cambio, el valor de  $b^*$  disminuyó significativamente después del tratamiento ( $p < 0,05$ ) (Kaya et al., 2015).

Por otro lado, se observó una disminución significativa de  $\alpha_{254}$  en jugo de kale procesado con 74 mJ/cm<sup>2</sup> de luz UV sin afectar el pH, contenido de sólidos solubles, viscosidad y parámetros del color. Esto podría deberse a la agregación de partículas dispersas o la fragmentación de compuestos absorbentes de luz. El jugo de kale presentaba un coeficiente de absorción mayor ( $\alpha = 109 \text{ cm}^{-1}$ ) al de las bebidas proteicas con un pH 5,69. El tratamiento UV-C condujo a un aumento inicial del 49% en el pardeamiento en comparación con el jugo sin tratar en el día cero (Pierscianowski et al., 2021).

No se observaron cambios significativos en el coeficiente de absorción en mezcla de jugo verde compuesto por kale y lechuga romana tratado después de una dosis UV-C de 2,93 kJ/L ( $\alpha = 22$  a  $24 \text{ cm}^{-1}$ ), al igual que en la viscosidad ( $p > 0,05$ ). Se encontraron valores idénticos de pH, sólidos solubles totales y acidez titulable para la mezcla de jugo verde tratado UV y no tratado (pH 3,39; 6,8% sólidos solubles; 0,50% acidez titulable). El tratamiento UV-C tuvo un efecto "ligeramente perceptible" en el color de la muestra tratada con 0,88 kJ/L, y un efecto "perceptible" en la muestra tratada con 2,93 kJ/L de luz UV-C (Biancanello et al., 2018).

En alimentos proteicos como la clara de huevo, se observó un aumento en la absorbancia a 280 nm con tiempos de exposición prolongados a la luz UV (Manzocco et al., 2012). Los autores lo atribuyeron a la formación de productos tempranos de reacción de pardeamiento no enzimático. También se asociaron a la formación de agregados proteicos consecuencia de modificaciones estructurales de las proteínas de clara de huevo con el tratamiento UV-C. Lo que podría explicar también el efecto de la luz UV-C en el cambio del coeficiente de absorción en la Bebida C de nuestra tesis (Manzocco et al., 2012).

En la actualidad, existen pocos estudios que analicen el efecto de la luz UV-C en la calidad de productos lácteos. En un sistema por lote, el coeficiente de absorción disminuyó con un

aumento de la longitud de onda desde 222, 254 y 282 nm en la leche de vaca (3,25% de grasa) tratada con UV-C. Los coeficientes obtenidos fueron de  $\alpha_{222} = 805,2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha_{254} = 476,2 \text{ cm}^{-1}$  y  $\alpha_{282} = 467,6 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados indican que existe mayor profundidad de penetración de los fotones UV utilizando longitudes de onda más largas, como los 254 nm utilizados en esta Tesis (Yin et al., 2015).

Se encontraron diferencias significativas en la acidez titulable en las muestras de leche tratadas con 880 J/L y 1760 J/L el día 28 de almacenamiento refrigerado en comparación con el control, las cuales correspondieron a 0,16% de ácido láctico para las muestras tratadas con UV respecto a la leche control que exhibió una acidez titulable de 0,32% de ácido láctico que se asocia a un mayor crecimiento microbiano y una menor vida útil. Adicionalmente, los panelistas detectaron diferencias ( $p < 0,01$ ) entre la leche tratada con 880 J/L y 1760 J/L respecto al control durante todo el almacenamiento evaluado. Las evaluaciones entre las muestras fueron evaluadas con un test triangular ( $n = 36$ ). Los panelistas indicaron que percibieron defectos como "quemado", "apagado", "fuerte" y "obsoleto" entre las muestras tratadas con UV asociados a la oxidación de lípidos, aunque no se evaluó el grado de diferencia o el tipo de diferencia (Rossitto et al., 2012).

Cilliers et al. (2014) estudiaron el efecto de la luz UV-C en las propiedades sensoriales de leche cruda. Los resultados indicaron la leche UV tenía un sabor y aroma a leche cremosa definida y perceptible, pero más bajo que el de las muestras tratadas con tratamiento combinado de pasteurización térmica y UV ( $p < 0,05$ ) utilizando dos descriptores principales como "grasosa" y "cartón o metálico". No se detectaron diferencias en el aroma o sabor a leche agria en ninguna de las muestras analizadas ( $p > 0,05$ ) (Cilliers et al., 2014).

El tratamiento UV de  $45,2 \text{ mJ/cm}^2$  en leche de chufa (leche vegetal de baja acidez) no provocó cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en el pH o en el porcentaje de sólidos solubles totales. Esta bebida presenta un pH 6,5, más básico en comparación a las bebidas proteicas, y una menor cantidad de sólidos solubles igual a  $4,5^\circ$  Brix. La acidez titulable y la viscosidad cambiaron significativamente ( $p > 0,05$ ) después de la aplicación de luz UV en la bebida vegetal, con una disminución de 21,7% y un aumento de 16,4%, respectivamente (Zhu et al., 2019).

### **7.3. Efecto de la luz UV-C y antimicrobianos en la inactivación microbiana**

La tecnología de obstáculos es una alternativa promisorio de procesamiento de alimentos que se beneficia de las interacciones sinérgicas y/o aditivas entre los factores de estrés aplicados en niveles subletales para la inactivación microbiana, lo que ayuda a disminuir los efectos perjudiciales no deseados en la calidad del producto, al tiempo que garantiza la inocuidad de estos (Leistner, 2000). En la actualidad, no existen estudios que hayan analizado el efecto de la luz UV-C y antimicrobianos en la inactivación microbiana en bebidas proteicas. En nuestro

modelo, se demostró que el tratamiento combinado UV y vainillina consiguió un aumento adicional de las inactivaciones de *E. coli* y *L. innocua* entre 0,34 a 0,72 log UFC/mL, respecto del procesamiento UV-C individual en todas las formulaciones de bebidas proteicas. Por ejemplo, en la bebida C el procesamiento combinado (dosis UV-C de 47,72 kJ/m<sup>2</sup> y vainillina 0,1% p/v) se alcanzó una reducción de 5,17 log de *L. innocua*, mientras que en la misma bebida tratada con UV-C solo se consiguió una inactivación de 4,45 log. No se puede concluir si la adición de vainillina generó un efecto aditivo o sinérgico en la inactivación microbiana en las bebidas proteicas tratadas con luz UV-C, ya que no se analizó el efecto por sí solo de este antimicrobiano en la reducción de los microorganismos estudiados. Otros resultados del laboratorio indicaron que la adición de vainillina a concentraciones de 1,0 g/L y 1,5 g/L en las bebidas proteicas redujeron *E. coli* en 0,3 y 0,4 log UFC/mL a los 14 días de almacenamiento a 4°C. En *L. innocua*, en cambio, se alcanzó una reducción de 1,0 y 1,4 log UFC/mL para las bebidas con vainillina 1,0 g/L y 1,5 g/L respectivamente durante el mismo período en almacenamiento refrigerado.

Adicionalmente, se cumplió con las regulaciones de la FDA que aprueba el uso de tratamientos alternativos a la pasteurización térmica siempre que se obtenga una reducción de 5 log en los recuentos de microorganismos patógenos asociados a un producto en particular. En resumen, se obtuvieron inactivaciones entre 4,63 y 5,03 log de *E. coli* y entre 5,03 y 5,14 log de *L. innocua* en las bebidas proteicas tratadas con UV y vainillina. Esto quiere decir que se logró una eficacia germicida equivalente a 99,999%.

El tratamiento combinado de UV y antimicrobianos naturales ya ha sido probado en mezclas de jugo de frutas. Se alcanzaron reducciones de al menos 5 log de *L. plantarum*, *E. coli* y *S. cerevisiae* después del procesamiento UV-C (390 mJ/cm<sup>2</sup>) y antimicrobianos (vainillina 1000 ppm y citral 100 ppm) aplicado a mezclas de jugos de naranja-mandarina y de naranja-plátano-mango-kiwi-frutilla. Se observó una inactivación adicional de 0,7 y 0,5 log para *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente, cuando se aplicó UV y antimicrobianos en ambos jugos en comparación a los jugos tratados con UV-C. Esto demuestra que el tratamiento combinado de los jugos generó efectos aditivos y sinérgicos sobre *E. coli* y *S. cerevisiae* durante el almacenamiento refrigerado (Ferrario et al., 2020).

Adicionalmente, se ha probado el efecto de la adición de antimicrobianos a vegetales y frutas tratados con UV-C. La aplicación de formulaciones compuestas por lemongrass u oregano, extracto de cítricos y ácido láctico en proporción de 0,01:0,1:1 respectivamente tras el procesamiento UV a una dosis de 10 kJ/m<sup>2</sup> mejoró la reducción hasta en 1,5 log de *L. monocytogenes* y *E. coli* inoculadas en coliflor fresco. En cambio, la aplicación de luz UV por sí sola provocó una reducción de aproximadamente 1 log de *L. monocytogenes* en

comparación con la muestra control. Adicionalmente, la aplicación de una dosis UV-C de 10 kJ/m<sup>2</sup> provocó una reducción de 1 log de levaduras y mohos en muestras de coliflor y se obtuvo una reducción de 2 log cuando se aplicó la formulación de antimicrobianos en muestras de coliflor después del tratamiento UV-C (Tawema et al., 2016).

Se reportaron reducciones de 1,29 log de *L. monocytogenes* y de 1,40 log de *S. Typhimurium* después del tratamiento combinado de UV-C (1,2 kJ/m<sup>2</sup>) y cinamaldehído (TC) y aceite de corteza de canela en la superficie de acelga roja con efectos antimicrobianos aditivos. Se observó daño en las membranas de ambos patógenos luego del tratamiento combinado mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido. Además, las reducciones en los recuentos microbianos se mantuvieron durante el almacenamiento y el análisis sensorial demostró que el tratamiento combinado no influyó en la calidad de la acelga roja (Park et al., 2018).

En frutos secos de caqui, la aplicación de 3,6 kJ/m<sup>2</sup> UV-C seguida de la adición de aceite de clavo de olor 1,56% v/v mostró efectos sinérgicos en la inactivación de *R. oryzae* y *A. niger*. Se alcanzaron reducciones máximas de 3,05 y 3,72 log de *R. oryzae* y *A. niger* con el tratamiento combinado de luz UV-C y aceite de clavo de olor. La aplicación de aceite de clavo de olor a frutos secos de caqui prolongó la vida útil del producto en al menos 28 días y tuvo un efecto positivo en las propiedades organolépticas de las muestras de caqui (Vurmaz & Gündüz, 2020).

En comparación a los demás estudios, el tratamiento UV y vainillina consiguió altos valores de inactivación microbiana en las bebidas proteicas a pesar de presentar elevados coeficientes de absorción entre 46,89 y 49,59 cm<sup>-1</sup>. Se debe seguir investigando los efectos de la luz UV y vainillina en las características sensoriales de las bebidas.

#### **7.4. Resistencia UV-C de microorganismos**

En las bebidas proteicas se observó una mayor sensibilidad de *L. innocua* a la luz UV-C respecto a *E. coli* (Figura 8) que es un microorganismo Gram negativo, ya que en todas las curvas de inactivación (tanto UV como tratamiento combinado) mostraron valores de  $n < 1$ . Lo que se relaciona a una prevalencia de la concavidad hacia arriba en las curvas de *Listeria* reflejando que el proceso fue más efectivo en los primeros 10 minutos de tratamiento y luego se volvió menos efectivo. Adicionalmente, el parámetro *b* de *L. innocua* en las bebidas tratadas con luz UV tomo valores entre 0,41 y 0,60 y en aquellas con UV y vainillina entre 0,63 y 0,71, siendo mayor en comparación a *E. coli*. Para las bebidas inoculadas con este microorganismo, los valores de *b* fueron de 0,19 – 0,36 y 0,39 – 0,42 cuando se aplicó luz UV-C y el tratamiento combinado respectivamente. Por lo tanto, la diferencia del valor *b* entre las muestras UV y vainilla y solo UV fue más acentuada en las bebidas con *L. innocua*.

Esta tendencia se contradice a la noción de que las bacterias Gram positivas son generalmente más resistentes a la radiación UV que las bacterias Gram negativas debido a la gruesa membrana de peptidoglicano que puede proteger eficazmente las células contra la radiación UV-C (Souza & Koutchma, 2021). Sin embargo, la sensibilidad a la luz UV de los microorganismos también se ve afectada por la composición de la pared celular, la presencia de proteínas absorbentes de luz ultravioleta, diferencias en la estructura de los ácidos nucleicos y por su capacidad de reparar el ADN dañado por la luz UV (Antonio-Gutiérrez et al., 2019).

En otros trabajos se observó una sensibilidad similar de los microorganismos frente a la luz UV-C. En jugo de manzana procesado con UV-C se observó que las dosis UV para alcanzar 1 reducción decimal ( $\delta$ ) obtenido con el modelo Weibull fue de 1273,31 mJ/cm<sup>2</sup> para *E. coli*, de 567,76 mJ/cm<sup>2</sup> para *S. enterica* (Gram negativo) y de 539,36 mJ/cm<sup>2</sup> para *L. monocytogenes*. Por lo tanto, *E. coli* fue el microorganismo más resistente y necesitó una dosis UV casi dos veces mayor para reducir 1 ciclo logarítmico su población, respecto a *L. monocytogenes* (Nicolau-Lapeña et al., 2022).

También se observó una mayor sensibilidad de los patógenos Gram positivos en comparación a las bacterias Gram negativas en agua de coco tratado con luz UV-C. Se informaron reducciones máximas de 7,54 – 7,79; 5,96 – 7,32 y 3,12 - 4.46 para *L. rhamnosus* (Gram positivo), *S. Typhimurium* (Gram negativo) y *S. cerevisiae* en agua de coco procesada con luz UV-C (26400 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 10 min, respectivamente. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la sensibilidad de los microorganismos a la inactivación por luz UV-C, como lo demuestran los parámetros A y  $\mu_{\max}$  de la función beta, siendo *L. rhamnosus* el microorganismo más sensible al tratamiento UV (Ochoa-Velasco et al., 2018).

En cambio, en clara de huevo líquida se observó que el cóctel de 5 cepas de *E. coli* O157:H7 presentaba la menor resistencia UV-C con un valor  $D_{UV-C}$  de 26,44 min y  $D_{UV-C}$  correspondiente de 170,71 mJ/cm<sup>2</sup> para la reducción de 1 ciclo logarítmico. Por otra parte, *S. enterica* y *L. monocytogenes* tenían valores  $D_{UV-C}$  de 29,73 y 32,42 min y  $D_{UV-C}$  de 191,97 y 209,29 mJ/cm<sup>2</sup> respectivamente. En este estudio, el cóctel de 4 cepas de *P. aeruginosa* (Gram negativa) mostró la mayor resistencia a los rayos UV-C con un valor  $D_{UV-C}$  de 37,22 (240,33 mJ/cm<sup>2</sup>) (Gabriel et al., 2017).

En alimentos líquidos de baja acidez, se ha distinguido una mayor resistencia de bacterias Gram positivas por luz UV-C. En leche de chufa tratada con una dosis de 45,2 mJ/cm<sup>2</sup>, *L. innocua* (Gram positivo) exhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) más tolerancia a la luz UV-C en comparación con *E. coli* P36 y *S. Typhimurium* WG49. Las dosis UV-C para la reducción de 1 ciclo logarítmico (valor  $\delta$ ) fueron de 0,91, 1,42 y 2,50 mJ/cm<sup>2</sup> para *S. Typhimurium* WG49,

*E. coli* P36 y *L. innocua* ATCC 51742 respectivamente obtenidos con el modelo de Weibull (Zhu et al., 2019).

Asimismo, Crook et al., (2015) evaluaron la resistencia al UV-C de siete patógenos en leche (*Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *Salmonella Senftenberg*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), siendo *L. monocytogenes* el más resistente a los rayos UV, el cual requirió 2000 J/L de exposición a los rayos UV-C para alcanzar una reducción de 5 log. La bacteria más sensible fue *S. aureus*, que requirió solo 1450 J/L para alcanzar una reducción de 5 log (Crook et al., 2015)

Barut et al. (2021) reportaron inactivaciones de 4,58 y 3,19 log de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *L. innocua*, respectivamente, a una dosis de 2978 J/L en leche UHT al 3,8% de grasa ( $\alpha = 896 \text{ cm}^{-1}$ ) utilizando un reactor UV de película delgada. Estos microorganismos exhibieron una diferencia significativa en la sensibilidad al tratamiento UV-C ( $p < 0,05$ ) (Barut et al., 2021).

Por lo tanto, la variabilidad encontrada entre las resistencias UV de los microorganismos pueden ser explicadas por las diferencias entre los diseños de los equipos UV y las condiciones de procesamiento que dificultan la comparación de los resultados entre los diversos estudios. Además, el efecto germicida UV-C depende de las especies y cepas bacterianas, la etapa de cultivo, la densidad del microorganismo y también las características del medio de cultivo (Souza & Koutchma, 2021).

### **7.5. Cinética de inactivación por luz UV-C**

Existen diferentes enfoques para describir la cinética de inactivación de microorganismos por luz UV, siendo la inactivación de primer orden el enfoque más simple para describir la inactivación microbiana por UV. El modelo log-lineal correlaciona negativamente la concentración de microorganismos y la dosis UV (Souza & Koutchma, 2021).

En diferentes modelos alimenticios se han descrito cinéticas de inactivación UV de primer orden. En jugo de naranja (pH 3,64; 13,1° Brix), los datos de inactivación UV de las cepas individuales de *E. coli* O157: H7 se ajustaron con el modelo log-lineal, mientras que la inactivación de cocteles de cepas de *E. coli* en función de la dosis de UV se desvió de la linealidad (Oteiza et al., 2010). En un sistema discontinuo, 15 de las 18 cepas de levadura probadas exhibieron inactivaciones UV ajustadas a la regresión lineal en jugo de naranja (pH 3,71; 11,6° Brix) con  $R^2 > 90\%$  (Feliciano et al., 2019).

En alimentos con mayor pH y capacidad de absorbancia UV, también se han reportado cinéticas de inactivación lineales. En un sistema por lote, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium* muestran cinéticas de inactivación de primer orden en clara de huevo líquida (pH 8,89) tratada con UV ( $R^2 = 0,91 - 0,98$ ) (Gabriel et al., 2017). Por otro lado,

se describió la cinética de inactivación de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* por luz UV con modelos lineales en leche bovina desnatada (pH 6,94). No se observó cola en las curvas de inactivación de los microorganismos estudiados, lo que se relacionó con el alto mezclado en un reactor de flujo tipo Dean (Ward et al., 2018).

Debido a factores microbiológicos y experimentales como la heterogeneidad entre las células de una población y la insuficiente uniformidad del tratamiento, se observan comúnmente dos desviaciones principales de la cinética de primer orden en los estudios de cinética UV, el hombro y la cola (Souza & Koutchma, 2021).

En las diferentes formulaciones de bebidas proteicas (pH 4,75 – 5,08;  $\alpha = 46,89 - 49,59 \text{ cm}^{-1}$ ) en nuestro sistema UV continuo, el modelo Weibull resultó apropiado para representar los datos de supervivencia ya que se obtuvieron valores elevados de  $R^2$  entre 93,9% y 99,0% para las inactivaciones UV de *E. coli* y *L. innocua*. Tanto las muestras procesadas con UV-C como las UV-C y vainillina para ambos microorganismos obtuvieron valores de  $n < 1$  que se vincula a una concavidad ascendente de la curva de supervivencia, que indicaría una mayor sensibilidad de los organismos supervivientes por la acumulación de daños (Figura 6 y 8). Es decir, las curvas de supervivencia presentan una fase inicial rápida de muerte (sin hombro), y terminan con una fase lenta de disminución de la población denominada cola. El efecto de cola está estrechamente relacionado con la presencia de miembros resistentes en la población y/o la presencia de sólidos en suspensión con alta absorción UV.

Este tipo de comportamiento se observó en agua de coco, donde la luz UV-C produjo inactivaciones no lineales de *L. rhamnosus*, *S. Typhimurium* y *S. cerevisiae* según Ochoa-Velasco et al., (2018). La mayoría de las curvas a diferentes velocidad de flujo exhiben una concavidad hacia arriba en agua de coco (líquido casi transparente), al igual que en las curvas de inactivación de *E. coli* y *L. innocua* en las bebidas tratadas con UV y vainillina de esta Tesis.

Las inactivaciones de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en un sistema UV discontinuo siguieron un comportamiento de decaimiento exponencial sin efecto de cola y estuvieron altamente representadas por el Modelo Weibull en leche descremada (Amiali et al., 2015). En la leche bovina, las curvas de inactivación de 7 bacterias transmitidas por los alimentos fueron sigmoideas con dosis máximas UV de 2,000 J/L que pueden explicarse por una “cinética de impactos múltiples”, que es el resultado del efecto acumulativo de la dosis UV usando un equipo de capa delgada de flujo turbulento (Crook et al., 2015).

Fenoglio et. al (2019) analizaron las inactivaciones de *E. coli* ATCC 25922, *S. cerevisiae* KE 162 y *L. plantarum* ATCC 8014 en diferentes sistemas tratados con UV-C (0–390 mJ/cm<sup>2</sup>) tales como jugos de pera claro, de naranja-mandarina y naranja-plátano-mango-kiwi-frutilla.

En general, las curvas de inactivación por luz UV-C en todas las matrices probadas exhibieron concavidad ascendente con presencia de cola. La aparición de la cola podría atribuirse, entre otras razones, a la existencia de miembros más resistentes en la población microbiana y/o a la presencia de sólidos en suspensión con alta absorción de UV. Excepcionalmente, las inactivaciones de *L. plantarum* y *S. cerevisiae* en las mezclas de jugos turbios tratadas con UV-C exhibieron concavidad hacia abajo con un hombro importante, que se atribuye comúnmente al daño y reparación del ADN. Por lo tanto, se espera observar regiones de hombro, especialmente en alimentos líquidos tratados con UV-C debido a la atenuación de la luz, lo que disminuye la tasa de impacto de los fotones en los microorganismos y lo que permite que se desarrollen mecanismos de reparación del ADN (Fenoglio et al., 2019)

Las curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 8739 en la sidra de manzana (pH 3,65;  $\alpha = 17,41 \text{ cm}^{-1}$ ) exhiben ligeros efectos de hombro y cola que se notan a diferentes velocidades de flujo y tasas de agitación en una unidad piloto Taylor-Couette (Orlowska et al., 2014). El efecto de cola fue asociado con la distribución no uniforme de la luz UV debido a una mezcla insuficiente cuando se trabajó a bajas velocidades de flujo en el sistema. Las curvas que presentaron hombro, por otra parte, correspondieron a los ensayos con sidra de manzana sin agitación (0 rpm). En nuestro sistema se mejoró la homogeneidad del tratamiento con un agitador magnético, pero podría aumentarse el efecto de la luz UV en las bebidas aumentando la turbulencia del líquido, de manera de conseguir mayores inactivaciones sin el efecto de cola.

## 8. CONCLUSIONES

- El tratamiento UV-C provocó reducciones entre 3,95 – 4,31 log UFC/mL de *E. coli* y 4,45 – 4,69 log UFC/mL de *L. innocua* en las bebidas proteicas.
- El tratamiento combinado de luz UV-C y vainillina (0,1% p/v) en las bebidas proteicas consiguió mayores niveles de inactivación entre 4,63 – 5,03 log UFC/mL de *E. coli* y 5,03 – 5,17 log UFC/mL de *L. innocua*.
- Las curvas de inactivación se modelaron aplicando modelo de Weibull, resultando apropiado para representar los datos de supervivencia con altos valores de  $R^2$  entre 93,9% y 99,0% para las distintas condiciones analizadas.
- El parámetro  $b$  fue mayor en la mayoría de los casos en la formulación C que presentó el menor coeficiente de absortividad, que se relaciona a una mejor transmisión de la luz UV-C en el alimento.
- Tanto las muestras procesadas con UV-C como las UV + vainillina obtuvieron valores de  $n < 1$  que se vincula a una fuerte inactivación desde el comienzo del tratamiento y a una concavidad ascendente de la curva de supervivencia.
- La adición de vainillina en todas las formulaciones de bebidas proteicas provocó un aumento del valor de  $b$  respecto a las mismas bebidas tratadas solo con UV, además



todas las formulaciones sometidas al tratamiento combinado presentaron  $n < 1$ . El procesamiento de luz UV-C y vainillina en todas las bebidas produjo curvas más estrechas con mayor moda y con una marcada reducción en la dispersión (menor media y varianza) y sesgo a la derecha, comparados con las bebidas tratadas sólo con UV-C.

- En el caso de *L. innocua* todas las curvas de inactivación, tanto las muestras procesadas con UV-C como los tratamientos combinados, exhibieron mayores valores de  $b$  y valores de  $n < 1$  y, lo que indicaría una mayor sensibilidad de *Listeria* a cortos tiempos de exposición en comparación con *E. coli*.
- El procesamiento UV y vainillina de las bebidas proteicas consigue la reducción mínima de 5 log del patógeno de interés exigido por la FDA para el tratamiento de alimentos con la tecnología UV (equivalente a una eficacia germicida de 99,999%).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Karim Shah, N. N., Shamsudin, R., Abdul Rahman, R., & Adzahan, N. M. (2016). Fruit Juice Production Using Ultraviolet Pasteurization: A Review. In *Beverages* (Vol. 2, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/beverages2030022>
- Alzamora, S. M., Guerrero, S., López-Malo, A., & Palou, E. (2003). Plant antimicrobials combined with conventional preservatives for fruit products. In *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods* (pp. 235–249). <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-669-6.50016-2>
- Amaral, G. V., Silva, E. K., Costa, A. L. R., Alvarenga, V. O., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Guimarães, J. T., Freitas, M. Q., Sant'Ana, A. S., Cunha, R. L., Moraes, J., Silva, M. C., Meireles, M. A. A., & Cruz, A. G. (2018). Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physical properties and sensory acceptance. *LWT*, 92, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.005>
- Amiali, M., Attal, S., Bitam, A., Benchabane, A., & Moreno García, L. (2015). Inactivation of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) in Skimmed Bovine Milk using UltraViolet-C Irradiation. *International Journal of Advanced Research*, 3, 387–395.
- Anema, S. G. (2014). Chapter 9 - The Whey Proteins in Milk: Thermal Denaturation, Physical Interactions, and Effects on the Functional Properties of Milk. In Harjinder Singh, M. Boland, & A. B. T.-M. P. (Second E. Thompson (Eds.), *Food Science and Technology* (pp. 269–318). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00009-X>
- Antonio-Gutiérrez, O., López-Díaz, A., Palou, E., López-Malo, A., & Ramírez-Corona, N. (2019). Characterization and effectiveness of short-wave ultraviolet irradiation reactors operating in continuous recirculation mode to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in grape juice. *Journal of*

*Food Engineering*, 241, 88–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.011>

- Antonio-Gutiérrez, O. T., López-Díaz, A. S., López-Malo, A., Palou, E., & Ramírez-Corona, N. (2019). 7 - UV-C Light for Processing Beverages: Principles, Applications, and Future Trends (A. M. Grumezescu & A. M. B. T.-P. and S. of B. Holban (Eds.); pp. 205–234). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815259-1.00007-0>
- Barros, C. P., Grom, L. C., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Almada, C. N., Pimentel, T. C., Venâncio, E. L., Collopy Junior, I., Maciel, P. M. C., Freitas, M. Q., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Duarte, M. C. K. H., Sant'Ana, A. S., & Cruz, A. G. (2021). Paraprobiotic obtained by ohmic heating added in whey-grape juice drink is effective to control postprandial glycemia in healthy adults. *Food Research International*, 140, 109905. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109905>
- Barukčić, I., Božanić, R., & Tratnik, L. (2008). Whey-based beverages-a new generation of dairy products. *Mljekarstvo*, 58, 257–274.
- Barut Gök, S., Vetter, E., Kromm, L., Hansjosten, E., Hensel, A., Gräf, V., & Stahl, M. (2021). Inactivation of *E. coli* and *L. innocua* in milk by a thin film UV-C reactor modified with flow guiding elements (FGE). *International Journal of Food Microbiology*, 343, 109105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109105>
- Baysal, A. H. (2018). Chapter 24 - Short-Wave Ultraviolet Light Inactivation of Pathogens in Fruit Juices (G. Rajauria & B. K. B. T.-F. J. Tiwari (Eds.); pp. 463–510). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00024-2>
- Beristaín-Bauza, S., Martínez-Niño, A., Ramírez-González, A. P., Ávila-Sosa, R., Ruíz-Espinosa, H., Ruiz-López, I. I., & Ochoa-Velasco, C. E. (2018). Inhibition of *Salmonella Typhimurium* growth in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by hurdle technology. *Food Control*, 92, 312–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.010>
- Biancaniello, M., Popović, V., Avila, C., Ros-Polski, V., & Koutchma, T. (2018). Feasibility of a Novel Industrial-Scale Treatment of Green Cold-Pressed Juices by UV-C Light Exposure. *Beverages*, 4. <https://doi.org/10.3390/beverages4020029>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Blackburn, B. G., Mazurek, J. M., Hlavsa, M., Park, J., Tillapaw, M., Parrish, M., Salehi, E., Franks, W., Koch, E., Smith, F., Xiao, L., Arrowood, M., Hill, V., da Silva, A., Johnston, S., & Jones, J. L. (2006). Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 684–686. <https://doi.org/10.3201/eid1204.050796>
- Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 243–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.012>

- Brem, R., Guven, M., & Karran, P. (2017). Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. *Free Radical Biology and Medicine*, *107*, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.488>
- Burri, J., Graf, M., Lambelet, P., & Löliger, J. (1989). Vanillin: More than a flavouring agent—a potent antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *48*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740480107>
- Caminiti, I. M., Palgan, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A., & Lyng, J. G. (2012). The Effect of Ultraviolet Light on Microbial Inactivation and Quality Attributes of Apple Juice. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2), 680–686. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0365-x>
- Cappato, L. P., Ferreira, M., Moraes, J., Pessanha da Silva Pires, R., Rocha, R., Silva, R., Cucinelli, R., Tavares, M. I., Freitas, M., Napole Rodrigues, F., Calado, V., Raices, R., & Silva, M. (2018). Whey acerola-flavoured drink submitted Ohmic Heating: Bioactive compounds, antioxidant capacity, thermal behavior, water mobility, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Chemistry*, *263*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.115>
- Cava-Roda, R. M., Taboada, A., Palop, A., López-Gómez, A., & Marin-Iñiesta, F. (2012). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, *157*(2), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.003>
- Char, C. D., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2010). Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(5), 752–761. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0155-x>
- Char, C. D., Mitilinaki, E., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2010). Use of High-Intensity Ultrasound and UV-C Light to Inactivate Some Microorganisms in Fruit Juices. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(6), 797–803. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0307-7>
- Char, C., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, *20*(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.004>
- Chavan, R., & T, K. (2015). Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. *Journal of Food Processing & Technology*, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000495>
- Cheng, C., Jia, M., Gui, Y., & Ma, Y. (2020). Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the nutritional quality and aroma of Mandarin (Citrus unshiu) juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *64*, 102425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102425>
- Cheng, N., Barbano, D., & Drake, M. (2019). Effects of milk fat, casein, and serum protein concentrations on sensory properties of milk-based beverages. *Journal of Dairy Science*, *102*.

<https://doi.org/10.3168/jds.2018-16179>

- Choi, L. H., & Nielsen, S. S. (2005). The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *Journal of Food Quality*, 28(1), 13–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00002.x>
- Choudhary, R., Bandla, S., Watson, D. G., Haddock, J., Abughazaleh, A., & 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/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.009>
- Cilliers, F. P., Gouws, P. A., Koutchma, T., Engelbrecht, Y., Adriaanse, C., & Swart, P. (2014). A microbiological, biochemical and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 23, 94–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.005>
- Crook, J. A., Rossitto, P. V., Parko, J., Koutchma, T., & 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>
- Delaquis, P., Stanich, K., & Toivonen, P. (2005). Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1472–1476. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1472>
- Delorme, M. M., Guimarães, J. T., Coutinho, N. M., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Margalho, L. P., Pimentel, T. C., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Granato, D., Sant'Ana, A. S., Duarte, M. C. K. H., & Cruz, A. G. (2020). Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 146–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.001>
- Desmarchelier, P., & Fegan, N. (2011). *Pathogens in Milk | Escherichia coli* (J. W. B. T.-E. of D. S. (Second E. Fuquay (Ed.); pp. 60–66). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00393-9>
- Dortet, L., Veiga-Chacon, E., & Cossart, P. (2009). *Listeria Monocytogenes* (M. B. T.-E. of M. (Third E. Schaechter (Ed.); pp. 182–198). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00217-0>
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA). (2016). Safety of UV-treated milk as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, 14(1), 4370. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4370>
- Elsherbiny, N. M., Younis, N. N., Shaheen, M. A., & Elseweidy, M. M. (2016). The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathology - Research and Practice*, 212(9), 767–777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.06.004>

- Feliciano, R. J., Estilo, E. E. C., Nakano, H., & Gabriel, A. A. (2019). Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. *Food Microbiology*, 78, 73–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.003>
- Fenoglio, D., Ferrario, M., Schenk, M., & Guerrero, S. (2019). UV-C light inactivation of single and composite microbial populations in tangerine-orange juice blend. Evaluation of some physicochemical parameters. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 149–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.005>
- Fenoglio, D., Ferrario, M., Schenk, M., & Guerrero, S. (2020). Effect of pilot-scale UV-C light treatment assisted by mild heat on *E. coli*, *L. plantarum* and *S. cerevisiae* inactivation in clear and turbid fruit juices. Storage study of surviving populations. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108767. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108767>
- Ferrante, S., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1850–1856. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1850>
- Ferrario, M., Fenoglio, D., Chantada, A., & Guerrero, S. (2020). Hurdle processing of turbid fruit juices involving encapsulated citral and vanillin addition and UV-C treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108811>
- Ferreira, M. V. S., Cappato, L. P., Silva, R., Rocha, R. S., Neto, R. P. C., Tavares, M. I. B., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Bissagio, R. C., Ranadheera, S., Raices, R. S. L., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2019). Processing raspberry-flavored whey drink using ohmic heating: Physical, thermal and microstructural considerations. *Food Research International*, 123, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.045>
- Ferreira, T. V., Mizuta, A. G., Menezes, J. L. de, Dutra, T. V., Bonin, E., Castro, J. C., Szczerepa, M. M. dos A., Pilau, E. J., Nakamura, C. V., Mikcha, J. M. G., & Abreu Filho, B. A. de. (2020). Effect of ultraviolet treatment (UV-C) combined with nisin on industrialized orange juice in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *LWT*, 133, 109911. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109911>
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2004). The Potential Application of Vanillin in Preventing Yeast Spoilage of Soft Drinks and Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 67(2), 391–395. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.391>
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., & Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 104–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>
- Foegeding, E. A., Luck, P. J., & Vardhanabhuti, B. (2011). Milk Protein Products | Whey Protein Products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 873–878). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

- Food and Drug Administration, H. H. S. (2012). Irradiation in the production, processing and handling of food. Final rule. *Federal Register*, 77(231), 71312–71316. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84871861812&partnerID=40&md5=f872c5d55f17767e32e316e81c2b0cea>
- Forney, L. J., Pierson, J. A., & Ye, Z. (2004). Juice irradiation with Taylor-Couette flow: UV inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2410–2415. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.11.2410>
- Frank, C., Walter, J., Muehlen, M., Jansen, A., van Treeck, U., Hauri, A. M., Zoellner, I., Rakha, M., Hoehne, M., Hamouda, O., Schreier, E., & Stark, K. (2007). Major outbreak of hepatitis A associated with orange juice among tourists, Egypt, 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 156–158. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060487>
- Gabriel, A. A., & Pineda, J. K. F. (2014). Influences of vanillin and licorice root extract supplementations on the decimal reduction times of *Escherichia coli* O157:H7 in mildly heated young coconut liquid endosperm. *Food Control*, 38, 136–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.011>
- Gabriel, A. A., Vera, D. D., Lazo, O. M. Y., Azarcon, V. B., De Ocampo, C. G., Marasigan, J. C., & Sandel, G. T. (2017). *C. Food Control*, 73, 1303–1309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.060>
- Garay, P. A., Villalva, F. J., Paz, N. F., Goncalvez de Oliveira, E., Ibarguren, C., Alcocer, J. C., Curti, C. A., & Ramón, A. N. (2021). Formulation of a protein fortified drink based on goat milk whey for athletes. *Small Ruminant Research*, 201, 106418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106418>
- Gayán, E., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1168-7>
- Geveke, D. (2008). UV Inactivation of *E. coli* in Liquid Egg White. *Food and Bioprocess Technology*, 1. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0070-1>
- Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *Journal of Food Process Engineering*, 28(5), 437–452. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2005.00040.x>
- Guerrero-Beltran, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultraviolet-C Light Processing of Liquid Food Products. *Nonthermal Processing Technologies for Food*, 262–270. <https://doi.org/10.1002/9780470958360.ch19>
- Hernández-Hernández, H. M., Moreno-Vilet, L., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2019). Current status of

- emerging food processing technologies in Latin America: Novel non-thermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58, 102233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102233>
- Hinds, L. M., O'Donnell, C. P., Akhter, M., & Tiwari, B. K. (2019). Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 56, 102153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.04.006>
- Hussain, M. A., & Dawson, C. O. (2013). Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2(4), 585–589. <https://doi.org/10.3390/foods2040585>
- Hyson, D. A. (2011). A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *Advances in Nutrition*, 2(5), 408–420. <https://doi.org/10.3945/an.111.000513>
- Jain, S., Bidol, S. A., Austin, J. L., Berl, E., Elson, F., Williams, M. L., Deasy III, M., Moll, M. E., Rea, V., Vojdani, J. D., Yu, P. A., Hoekstra, R. M., Braden, C. R., & Lynch, M. F. (2009). Multistate Outbreak of Salmonella Typhimurium and Saintpaul Infections Associated with Unpasteurized Orange Juice—United States, 2005. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8), 1065–1071. <https://doi.org/10.1086/597397>
- Kamal, H., Jafar, S., Mudgil, P., Murali, C., Amin, A., & Maqsood, S. (2018). Inhibitory properties of camel whey protein hydrolysates toward liver cancer cells, dipeptidyl peptidase-IV, and inflammation. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 8711–8720. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2018-14586>
- Kassem, J. (2015). Future Challenges of Whey Proteins. *International Journal of Dairy Science*, 10, 139–159. <https://doi.org/10.3923/ijds.2015.139.159>
- Kaya, Z., Yıldız, S., & Ünlütürk, S. (2015). Effect of UV-C irradiation and heat treatment on the shelf life stability of a lemon–melon juice blend: multivariate statistical approach. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 230–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.005>
- Kelly, P. (2019). *Chapter 9 - Whey Protein Ingredient Applications* (H. C. Deeth & N. B. T.-W. P. Bansal (Eds.); pp. 335–375). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00010-2>
- King, A. A., Shaughnessy, D. T., Mure, K., Leszczynska, J., Ward, W. O., Umbach, D. M., Xu, Z., Ducharme, D., Taylor, J. A., DeMarini, D. M., & Klein, C. B. (2007). Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1), 60–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.022>
- Koutchma, T. B. T.-R. M. in F. S. (2016). *Ultraviolet Light for Decontamination and Preservation of Beverages, Liquid Foods, and Ingredients*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21200-6>

- Koutchma, T. (2008). UV light for processing foods. *Ozone: Science and Engineering*, 30(1), 93–98. <https://doi.org/10.1080/01919510701816346>
- Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2(2), 138–155. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0178-3>
- Koutchma, T. (2019). Ultraviolet light in food technology: Principles and applications. In *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1201/9780429244414>
- Koutchma, T, Forney, L. J., & Moraru, C. I. (2009). Ultraviolet light in food technology: Principles and applications. In *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84990301748&partnerID=40&md5=272885d829959f3e6fb8a7cb44d99222>
- Koutchma, T, & Parisi, B. (2004). Biodosimetry of Escherichia coli UV Inactivation in Model Juices with Regard to Dose Distribution in Annular UV Reactors. *Journal of Food Science*, 69(1), FEP14–FEP22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17862.x>
- Koutchma, Tatiana. (2014). *Chapter 10 - UV Safety* (T. B. T.-P. and S. L. E. Koutchma (Ed.); p. 59). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416621-9.00010-8>
- Koutchma, Tatiana, Bissonnette, S., & Popović, V. (2021). 2.17 - *An Update on Research, Development and Implementation of UV and Pulsed Light Technologies for Nonthermal Preservation of Milk and Dairy Products* (K. Knoerzer & K. B. T.-I. F. P. T. Muthukumarappan (Eds.); pp. 256–276). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22680-2>
- Koutchma, Tatiana, Parisi, B., & Unluturk, S. (2006). Evaluation of UV dose in flow-through reactors for fresh apple juice and cider. *Chemical Engineering Communications - CHEM ENG COMMUN*, 193, 715–728. <https://doi.org/10.1080/00986440500266842>
- Koutchma, Tatiana, & Popović, V. (2019). *Chapter 5 - UV Light-Emitting Diodes (LEDs) and Food Safety* (T. B. T.-U. L. E. D. T. for F. A. Koutchma (Ed.); pp. 91–117). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817794-5.00005-4>
- Koutchma, Tatiana, Popović, V., & Green, A. (2019). *Chapter 1 - Overview of Ultraviolet (UV) LEDs Technology for Applications in Food Production* (T. B. T.-U. L. E. D. T. for F. A. Koutchma (Ed.); pp. 1–23). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817794-5.00001-7>
- Kumar, S. S., Priyadarsini, K. I., & Sainis, K. B. (2004). Inhibition of Peroxynitrite-Mediated Reactions by Vanillin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 139–145. <https://doi.org/10.1021/jf030319d>
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Li, C., Meng, H., Wu, S., Fang, A., Liao, G., Tan, X., Chen, P., Wang, X., Chen, S., & Zhu, H. (2021). Daily Supplementation With Whey, Soy, or Whey-Soy Blended Protein for 6 Months Maintained



- Lean Muscle Mass and Physical Performance in Older Adults With Low Lean Mass. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 121(6), 1035-1048.e6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jand.2021.01.006>
- Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A., & Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
- Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Kawasaki, N., Choo, M.-K., Saitoh, Y., Aozuka, Y., Singhirunnusorn, P., Ruchirawat, S., Svasti, J., & Saiki, I. (2005). Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1), 57–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.01.015>
- López-Malo, A., & Palou, E. (2004). Ultraviolet Light and Food Preservation. In *Novel Food Processing Technologies* (pp. 405–421). <https://doi.org/10.1201/9780203997277.ch18>
- Lu, G., Li, C., & Liu, P. (2011). UV inactivation of milk-related microorganisms with a novel electrodeless lamp apparatus. *European Food Research and Technology*, 233, 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1498-5>
- Lu, M., & Wang, N. S. (2017). Chapter 7 - Spoilage of Milk and Dairy Products. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. B. T.-T. M. Q. of F. Sinigaglia (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 151–178). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00010-8>
- Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2004). Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87, E6–E12. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70056-9](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70056-9)
- Manzocco, L., Panozzo, A., & Nicoli, M. C. (2012). Effect of ultraviolet processing on selected properties of egg white. *Food Chemistry*, 135(2), 522–527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.028>
- Martin, N. H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2021). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1251–1261. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130>
- Mehmood, A. M. M. T., Iyer, A. B., Arif, S., Junaid, M., Khan, R. S., Nazir, W., & Khalid, N. (2019). 5 - *Whey Protein-Based Functional Energy Drinks Formulation and Characterization* (A. M. Grumezescu & A. M. B. T.-S. and E. D. Holban (Eds.); pp. 161–181). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00005-X>
- Menon, A., Stojceska, V., & Tassou, S. A. (2020). A systematic review on the recent advances of the energy efficiency improvements in non-conventional food drying technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 67–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.014>

- Moon, K.-D., Delaquis, P., Toivonen, P., & Stanich, K. (2006). Effect of vanillin on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in a model apple juice medium and in apple juice. *Food Microbiology*, 23(2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.02.005>
- Müller, A., Noack, L., Greiner, R., Stahl, M. R., & Posten, C. (2014). Effect of UV-C and UV-B treatment on polyphenol oxidase activity and shelf life of apple and grape juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 498–504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.05.014>
- Mungai, E. A., Behravesh, C. B., & Gould, L. H. (2015). Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 119–122. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140447>
- Nicolau-Lapeña, I., Colás-Medà, P., Viñas, I., & Alegre, I. (2022). Inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on apple peel and apple juice by ultraviolet C light treatments with two irradiation devices. *International Journal of Food Microbiology*, 364, 109535. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109535>
- Ochoa-Velasco, C. E., Díaz-Lima, M. C., Ávila-Sosa, R., Ruiz-López, I. I., Corona-Jiménez, E., Hernández-Carranza, P., López-Malo, A., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2018). Effect of UV-C light on *Lactobacillus rhamnosus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae* kinetics in inoculated coconut water: Survival and residual effect. *Journal of Food Engineering*, 223, 255–261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.010>
- Organization, W. H. (n.d.). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>
- Orlowska, M., Koutchma, T., Kostrzynska, M., Tang, J., & 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, 100–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.020>
- Oteiza, J. M., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. (2010). Ultraviolet Treatment of Orange Juice to Inactivate *E. coli* O157:H7 as Affected by Native Microflora. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 603–614. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0194-y>
- Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider--Connecticut and New York, October 1996. (1997). *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 46(1), 4–8.
- Özer, B., & Evrendilek, G. A. (2022). *Chapter 6 - Whey beverages* (A. G. da Cruz, C. S. Ranadheera, F. Nazzaro, & A. M. B. T.-D. F. Mortazavian (Eds.); pp. 117–137). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820478-8.00012-2>
- Park, J.-B., Kang, J. H., & Song, K. (2018). Combined treatment of cinnamon bark oil emulsion washing and ultraviolet-C irradiation improves microbial safety of fresh-cut red chard. *LWT*, 93, 109–115.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.035>

- Patel, S. (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.040>
- Patras, A., Bhullar, M. S., Pendyala, B., & Crapulli, F. (2021). 2.14 - Ultraviolet Treatment of Opaque Liquid Foods: From Theory to Practice (K. Knoerzer & K. B. T.-I. F. P. T. Muthukumarappan (Eds.); pp. 182–209). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22941-7>
- Pei, X., Tekliye, M., & Dong, M. (2021). Isolation and identification of fungi found in contaminated fermented milk and antifungal activity of vanillin. *Food Science and Human Wellness*, 10(2), 214–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.02.011>
- Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 353–380. <https://doi.org/10.1080/10408699891274246>
- Peleg, M., & Cole, M. B. (2000). Estimating the survival of Clostridium botulinum spores during heat treatments. *Journal of Food Protection*, 63(2), 190–195. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.2.190>
- Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia, A., & de Antoni, G. (2015). Novel functional whey-based drinks with great potential in the dairy industry. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 307–314. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.03.15.4043>
- Pierscianowski, J., Popović, V., Biancaniello, M., Bissonnette, S., Zhu, Y., & Koutchma, T. (2021). Continuous-flow UV-C processing of kale juice for the inactivation of E. coli and assessment of quality parameters. *Food Research International*, 140, 110085. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110085>
- Quintero-Ramos, A., Churey, J. J., Hartman, P., Barnard, J., & Worobo, R. W. (2004). Modeling of Escherichia coli inactivation by UV irradiation at different pH values in apple cider. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1153–1156. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1153>
- Ridge, A., Devine, A., Lyons-wall, P., Conlon, J., & Lo, J. (2018). The impact of whey protein supplementation in older adults on nutrient intakes and satiety over an 11-week exercise intervention. *Food Quality and Preference*, 68, 72–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.01.013>
- Rossitto, P. V., Cullor, J. S., Crook, J., Parko, J., Sechi, P., & Cenci-Goga, B. T. (2012). Effects of UV irradiation in a continuous turbulent flow UV reactor on microbiological and sensory characteristics of cow's milk. *Journal of Food Protection*, 75(12), 2197–2207. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-036>
- Rybarczyk, J., Kieckens, E., Vanrompay, D., & Cox, E. (2017). In vitro and in vivo studies on the antimicrobial effect of lactoferrin against Escherichia coli O157:H7. *Veterinary Microbiology*, 202, 23–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.010>

- Ryser, E. T. (2011). *Pathogens in Milk | Listeria monocytogenes* (J. W. B. T.-E. of D. S. (Second E. Fuquay (Ed.); pp. 81–86). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00394-0>
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., George, D. S., & Somasundram, C. (2015). Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food and Bioprocess Processing*, *94*, 313–321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.011>
- Schenk, M., Ferrario, M., & Guerrero, S. (2018). Antimicrobial Activity of Binary and Ternary Mixtures of Vanillin, Citral, and Potassium Sorbate in Laboratory Media and Fruit Purées. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(2), 324–333. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2013-1>
- Shukla, M. (2012). Development of Probiotic Beverage from Whey and Pineapple Juice. *Journal of Food Processing & Technology*, *04*. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000206>
- Silveira, M. R., Coutinho, N. M., Esmerino, E. A., Moraes, J., Fernandes, L. M., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Senaka Ranadheera, C., Borges, F. O., Neto, R. P. C., Tavares, M. I. B., Fernandes, F. A. N., Fonteles, T. V., Nazzaro, F., Rodrigues, S., & Cruz, A. G. (2019). Guava-flavored whey beverage processed by cold plasma technology: Bioactive compounds, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Chemistry*, *279*, 120–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.128>
- Singh, Harpreet, Bhardwaj, S. K., Khatri, M., Kim, K.-H., & Bhardwaj, N. (2020). UVC radiation for food safety: An emerging technology for the microbial disinfection of food products. *Chemical Engineering Journal*, 128084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128084>
- Singh, R., & Geetanjali. (2016). *Chapter 16 - Whey Proteins and Their Value-Added Applications* (G. B. T.-P. B. Singh Dhillon (Ed.); pp. 303–313). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00016-1>
- Singh, R., Rathod, G., Meletharayil, G. H., Kapoor, R., Sankarlal, V. M., & Amamcharla, J. K. (2022). Invited review: Shelf-stable dairy protein beverages—Scientific and technological aspects. *Journal of Dairy Science*, *105*(12), 9327–9346. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2022-22208>
- Skryplonek, K., Dmytrów, I., & Mituniewicz-Małek, A. (2019). Probiotic fermented beverages based on acid whey. *Journal of Dairy Science*, *102*(9), 7773–7780. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2019-16385>
- Souza, V. R., & Koutchma, T. (2021). *2.12 - Ultraviolet Light Microbial Inactivation in Liquid Foods* (K. Knoerzer & K. B. T.-I. F. P. T. Muthukumarappan (Eds.); pp. 146–170). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22971-5>
- Stewart, G. G. (2014). *SACCHAROMYCES | Saccharomyces cerevisiae* (C. A. Batt & M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello (Eds.); pp. 309–315). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>

- Tahavorgar, A., Vafa, M., Shidfar, F., Gohari, M., & Heydari, I. (2015). Beneficial effects of whey protein preloads on some cardiovascular diseases risk factors of overweight and obese men are stronger than soy protein preloads – A randomized clinical trial. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 2(3), 69–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnim.2015.08.002>
- Tawema, P., Han, J., Vu, K. D., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effects of combined UV-C or gamma radiation with natural antimicrobial formulations against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and total yeasts/molds in fresh cut cauliflower. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 451–456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.016>
- Tipparaju, S., Ravishankar, S., & Slade, P. J. (2004). Survival of *Listeria monocytogenes* in vanilla-flavored soy and dairy products stored at 8 degrees C. *Journal of Food Protection*, 67(2), 378–382. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.2.378>
- Tomadoni, B., Cassani, L., Moreira, M. R., & Ponce, A. (2015). Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 554–557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.039>
- Tran, M. T. T., & Farid, M. (2004). Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 495–502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.08.002>
- Usaga, J., Worobo, R. W., Moraru, C. I., & Padilla-Zakour, O. I. (2015). Time after apple pressing and insoluble solids influence the efficiency of the UV treatment of cloudy apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 1), 218–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.014>
- Villaño, D., Gironés-Vilapana, A., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2022). Chapter 12 - Development of functional foods (C. M. B. T.-I. S. in the F. I. (Second E. Galanakis (Ed.); pp. 193–207). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85203-6.00017-7>
- Vogel, K. G., Carter, B. G., Cheng, N., Barbano, D. M., & Drake, M. A. (2021). Ready-to-drink protein beverages: Effects of milk protein concentration and type on flavor. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 10640–10653. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2021-20522>
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2), 356–364. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.2.356>
- Vurmaz, A. K., & Gündüz, G. T. (2020). Inhibition of mold growth on the surface of dried persimmons using combined treatments of UV-C light and clove oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 61, 102336. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102336>
- Ward, D., Patras, A., Kilonzo-Nthenge, A., Yannam, S., Pan, C., Xiao, H., & Sasges, M. (2018). UV-C treatment on the safety of skim milk: Effect on microbial inactivation and cytotoxicity evaluation. *Journal of Food Process Engineering*, 42, e12944. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12944>

- Yemiş, G. P., Pagotto, F., Bach, S., & Delaquis, P. (2011). Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of cronobacter species. *Journal of Food Protection*, 74(12), 2062–2069. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-230>
- Yin, F., Zhu, Y., Koutchma, T., & 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/https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.014>
- Zhao, C., Chen, N., & Ashaolu, T. J. (2021). Whey proteins and peptides in health-promoting functions – A review. *International Dairy Journal*, 105269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105269>
- Zhu, Y., Elbrhami, A. A., Popović, V., Koutchma, T., & Warriner, K. (2019). Comparative Effects of Thermal, High Hydrostatic Pressure, and UV-C Processing on the Quality, Nutritional Attributes, and Inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Listeria* Introduced into Tiger Nut Milk. *Journal of Food Protection*, 82(6), 971–979. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-493>
- Zoellner, S. S., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A., Moura, M. R. L., Carvalho, L. M. J., & Sant'ana, A. S. (2009). Whey beverage with acai pulp as a food carrier of probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 64(2), 177–181. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-72949109123&partnerID=40&md5=1426414594c7fa6ea516953d0988b96f>