



# Criterios de Procesado para la Pasteurización de los Alimentos por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje

**MODALIDAD:** Zootecnia, Producción Animal y Tecnología de los Alimentos así como Ciencias Básicas relacionadas con las mismas

**LEMA:** Electrones para la conservación de los alimentos

## RESUMEN

---

El objetivo general de esta investigación fue establecer criterios del proceso aplicables en un proceso industrial para la pasteurización de alimentos líquidos por medio de la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) que pretende evitar los efectos adversos del calor sobre las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos. Se realizó un estudio inicial para identificar las cepas más resistentes a los tratamientos de PEAV entre cinco cepas de dos microorganismos patógenos Gram-positivos (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y dos microorganismos Gram-negativos (*Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*). Posteriormente, se obtuvieron datos cinéticos sobre la inactivación de las cepas más resistentes y los modelos matemáticos generados demostraron que los niveles de inactivación obtenidos, son insuficientes para garantizar la pasteurización de los alimentos. Estos resultados indicaron la necesidad de combinar los PEAV con otros factores como la temperatura y la adición de antimicrobianos para conseguir un nivel de inactivación suficiente.

Se demostró que la inactivación microbiana por PEAV dependió de la temperatura de tratamiento incluso a temperaturas no letales para los microorganismos. La presencia de nisina en el medio de tratamiento tuvo un efecto aditivo, o ligeramente sinérgico, en la inactivación por PEAV de las dos cepas Gram-positivas, mientras que este antimicrobiano no incrementó la letalidad de los PEAV en las cepas Gram-negativas. Sin embargo, la presencia del antimicrobiano N<sup>o</sup>-lauroil etilester (etil lauroil arginato, LAE), aumentó la letalidad de los tratamientos de PEAV, tanto en las cepas de los microorganismos Gram-positivos como en las de los Gram-negativos.

Los estudios de validación en flujo continuo en zumo de manzana demostraron que la combinación de los PEAV con temperaturas moderadas permitió definir criterios de procesado aplicables a escala industrial para conseguir reducir la población de las cuatro

cepas más resistentes de cada una de las especies bacterianas patógenas, al menos 5 ciclos logarítmicos, en zumo de manzana.

## ***ABSTRACT***

---

The general objective of this investigation was to define process criteria for food pasteurization by pulsed electric fields (PEF). The most PEF resistant strains between five strains of two pathogenic Gram-positive microorganisms (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) and two pathogenic Gram-negative microorganisms (*Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium) were selected. Mathematical models developed from the corresponding kinetics studies demonstrated that the inactivation levels obtained by PEF were too low for guarantee food pasteurization. Therefore the combination of PEF with other factors such as temperature or antimicrobial was required for increasing microbial death.

It was demonstrated that microbial inactivation by PEF strongly depended on the treatment temperature even at non-lethal temperatures for the microorganisms. The presence of nisin in the treatment medium had an additive or slightly synergistic effect on the PEF inactivation of Gram-positive strains but it was ineffective for the Gram-negative ones. However, N<sup>α</sup>-lauroil etilester (etil lauroil arginate, LAE) was effective in both Gram-positive and negative strains. Validation studies conducted in apple juice applying treatments in continuous flow demonstrated that the application of PEF at moderate temperatures permitted defining process criteria applicable at industrial scale for inactivating at least 5-Log<sub>10</sub> cycles in the population of the most PEF resistant pathogenic strains investigated.

## *1. INTRODUCCIÓN*

---

Los objetivos tradicionales de la conservación de los alimentos han sido prolongar su vida útil, para que éstos puedan ser consumidos días, semanas o incluso meses después de su procesado, y garantizar que los productos que llegan al consumidor sean seguros, es decir, que no vehiculen agentes que puedan causar enfermedades. Sin embargo, en los últimos años, la industria alimentaria demanda sistemas de conservación que, además de cumplir con estos dos objetivos, afecten lo menos posible a las características sensoriales y nutritivas de los alimentos (11). Con objeto de responder a esta demanda, se están investigando distintas alternativas a los tratamientos térmicos, que, al igual que el calor, sean capaces de inactivar microorganismos patógenos, pero sin alcanzar las temperaturas utilizadas en el procesado térmico que afectan a distintos compuestos termosensibles que determinan la calidad de los alimentos (13).

Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) es una de las tecnologías que se están investigando con este objetivo. La aplicación de campos eléctricos de alto voltaje durante periodos de tiempo del orden de microsegundos provoca una modificación irreversible de la permeabilidad de las membranas celulares de los microorganismos, causando la inactivación de las formas vegetativas de las bacterias, mohos y levaduras (43). Sin embargo, las formas esporuladas de las bacterias y de los mohos son resistentes a estos tratamientos (37), por lo que las aplicaciones de la tecnología de los PEAV se centra en la pasteurización de los alimentos. Aunque tradicionalmente los tratamientos de pasteurización se han asociado exclusivamente con el calor, el desarrollo de otras tecnologías capaces de inactivar microorganismos ha provocado que se consideren otras técnicas para pasteurizar alimentos. De este modo, la pasteurización ha sido redefinida como “cualquier proceso, tratamiento o combinación que es aplicado a los alimentos para reducir la población del microorganismo más resistente con

relevancia en la salud pública, hasta un nivel que no suponga un riesgo para la salud pública en unas condiciones normales de distribución y almacenamiento” (35). El principal objetivo de la pasteurización es, por lo tanto, garantizar que los alimentos que llegan al consumidor estén libres de flora vegetativa patógena. Este tratamiento, además de inactivar la flora patógena, reduce la flora alterante, lo que contribuye a prolongar el tiempo de vida útil de los alimentos. Sin embargo, en los alimentos pasteurizados pueden estar presentes esporos bacterianos y otros microorganismos sin relevancia en la salud pública, por lo que, tras el tratamiento es necesario refrigerar los alimentos con el fin de evitar o retrasar el crecimiento de los microorganismos supervivientes. En ocasiones, además de la refrigeración, se utilizan otras técnicas de conservación, como el envasado en atmósferas modificadas o la adición de antimicrobianos para mejorar la conservación de estos alimentos (40).

La implantación de tecnologías no térmicas para la pasteurización de los alimentos en la industria requiere demostrar no sólo que las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos no se ven afectadas por los tratamientos, sino que los niveles de seguridad microbiológica que se obtienen con estas tecnologías son equivalentes a los obtenidos con la pasteurización térmica. Para demostrar este segundo aspecto, es necesario identificar las cepas de microorganismos patógenos más resistentes a los PEAV y establecer los criterios de procesamiento necesarios para reducir la población de estos microorganismos a un nivel que garantice la seguridad de los alimentos.

En los últimos 15 años, se han realizado numerosos estudios sobre la inactivación microbiana por PEAV (52, 2, 34). Sus objetivos han sido fundamentalmente conocer los principales factores que influyen en la resistencia microbiana a los PEAV, describir la cinética de inactivación para desarrollar modelos matemáticos y comprender mejor los mecanismos implicados en la inactivación microbiana por estos tratamientos. A pesar

de la gran cantidad de investigaciones realizadas, resulta difícil obtener de ellas los datos necesarios para el diseño de procesos de pasteurización por PEAV debido a las grandes diferencias en las condiciones experimentales y los equipos utilizados por los distintos autores. Ello dificulta enormemente la comparación de los resultados obtenidos en distintos laboratorios.

*El **objetivo** de esta investigación fue evaluar la aplicación de la tecnología de los PEAV para la pasteurización de los alimentos. Las etapas que se siguieron para conseguir este objetivo fueron: (I) Identificar las cepas más resistentes a los PEAV de cuatro microorganismos patógenos; (II) obtener datos cinéticos sobre la inactivación microbiana de las cepas más resistentes para el desarrollo de modelos matemáticos; (III) combinar la tecnología de los PEAV con otros factores con objeto de conseguir niveles de inactivación en las cepas más resistentes que permitan garantizar la seguridad de los alimentos; (IV) validar los parámetros de procesado seleccionados en procesos en flujo continuo con alimentos.*

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **2.1 Microorganismos**

Para llevar a cabo esta investigación, se utilizaron cepas de las siguientes especies microbianas: *Listeria monocytogenes* (CECT 932, CECT 4031, CECT 4032, CECT 5366, CECT 5672), *Staphylococcus aureus* (CECT 976, CECT 4465, CECT 4630, CECT 4459, CECT 4466), *Salmonella* Typhimurium (CECT 443, CECT 722, CECT 880, CECT 878, CECT 4594) y *Escherichia coli* (CECT 471), suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), O157:H7, BJ4 y BJ4L1 (26). Todas las cepas fueron conservadas durante la investigación en crioviales (Maintenance Freeze Medium 064-TA0124, Scharlau

Chemie, Sentmenat, España) a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Ultra Low Temperature Freezer MDF-U32865, SANYO Electric, Osaka, Japón).

## **2.2 Tratamientos de PEAV**

### *2.2.1 Generador de PEAV*

El equipo consiste en un generador de pulsos eléctricos suministrado por la empresa ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia), cuyo esquema eléctrico se muestra en la Figura 2.1. Éste consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, ScandiNova) que convierte la corriente trifásica alterna (380 V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie (Switch rack SR-6, ScandiNova). Una señal eléctrica externa (TTL, 5 V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal pulsante de onda cuadrada. Finalmente, un transformador de pulsos (Pulse transformer, ScandiNova) convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada.

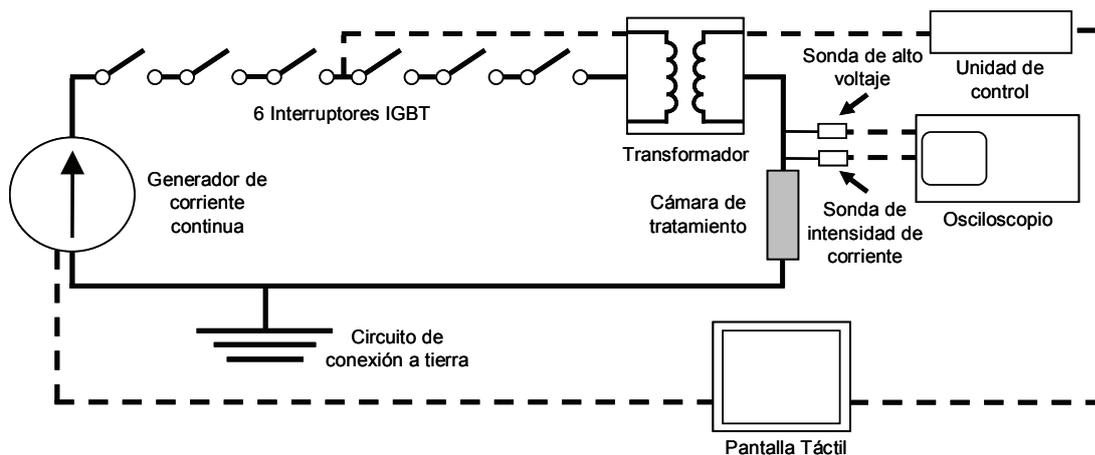
Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3  $\mu\text{s}$  de duración y de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz.

### *2.2.2 Cámaras de tratamiento*

#### *2.2.2.1 Cámara de tratamiento estática*

La cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos consta de un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable de 16

**Figura 2.1.** Configuración eléctrica del equipo de PEAV de onda cuadrada.

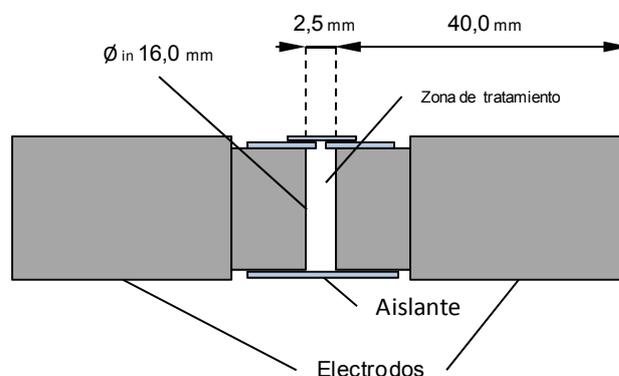


mm de diámetro (Figura 2.2). Estas tres estructuras delimitan la zona de tratamiento. Para la realización de los experimentos, se ajustó la distancia de los electrodos a 2,5 mm por lo que el volumen de tratamiento fue de 0,5 mL. Con objeto de llenar y vaciar la cámara fácilmente, ésta dispone de un orificio en el tubo de polietileno de 1,0 mm de diámetro.

#### 2.2.2.2 Cámara de tratamiento en flujo continuo

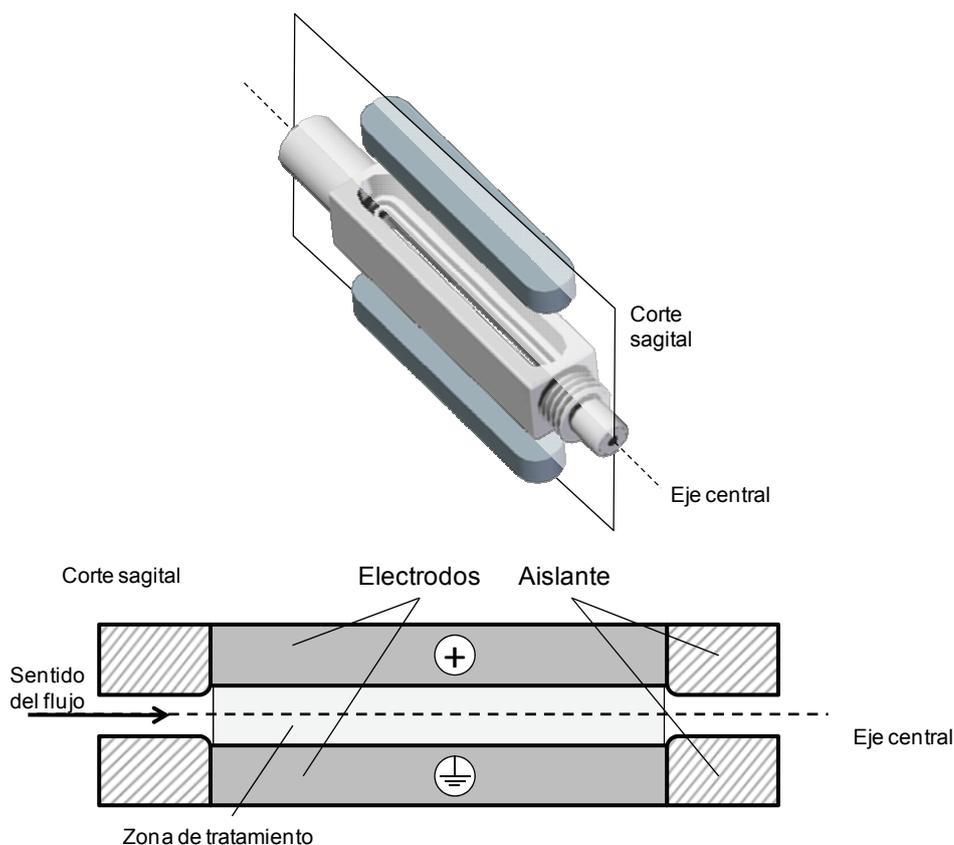
Para realizar los estudios de la eficacia letal de los PEAV en flujo continuo, se utilizó una cámara de electrodos paralelos (Figura 2.3)

La cámara utilizada se dimensionó considerando la conductividad eléctrica del medio de tratamiento con el que se iba a trabajar (zumo de manzana de 0,25-0,30



**Figura 2.2.** Esquema de la cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos.

**Figura 2.3.** Esquema básico de la cámara de electrodos paralelos utilizada en esta investigación. Separación entre electrodos: 4,5 mm; Longitud del electrodo: 40,0 mm.

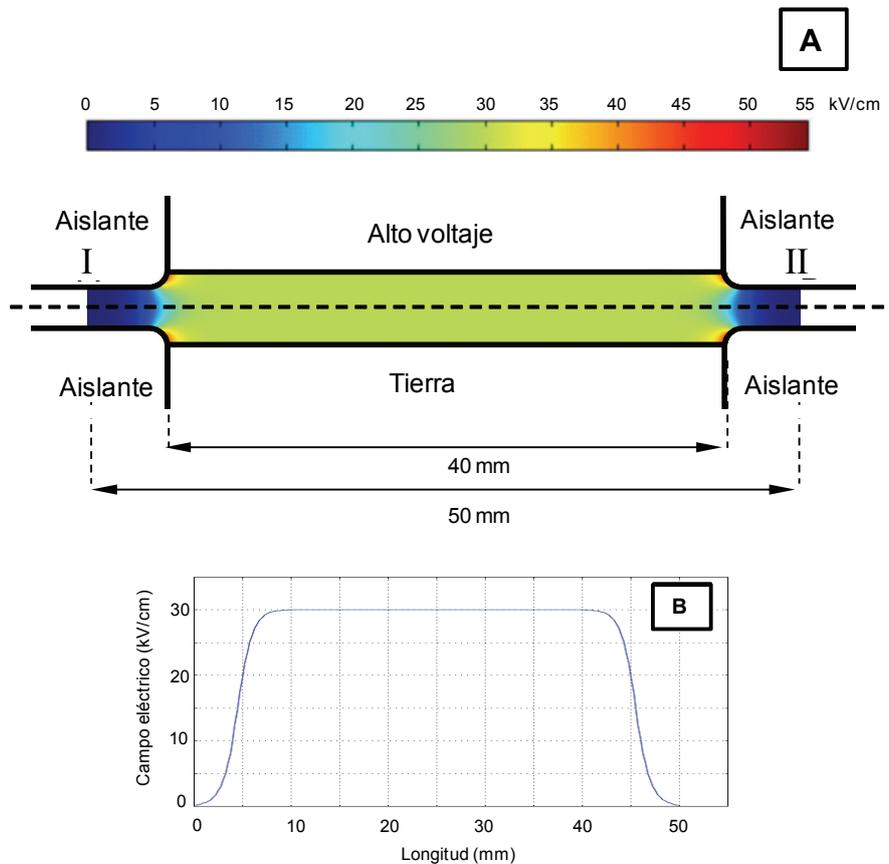


mS/cm), el rango de resistencias eléctricas óptimas de la cámara de tratamiento (entre 100 y 170  $\Omega$ ), la máxima intensidad de corriente que permite trabajar el generador de PEAV (200 A) y la máxima frecuencia de aplicación de los pulsos (300 Hz). La cámara de tratamiento consta de dos electrodos planos de acero inoxidable separados 4,5 mm por una pieza aislante de Teflón. Esta configuración crea una zona de tratamiento de sección cuadrada de una anchura de 4,5 mm, una altura de 3,7 mm y una longitud de 4 cm en la que el campo eléctrico generado es perpendicular a la dirección de flujo del producto. El volumen total de tratamiento es de 0,67 mL. Utilizando un flujo de producto de 3 L/h, el tiempo de residencia medio del producto en la zona de tratamiento es de 0,8 s. En estas condiciones, el número máximo de pulsos que es posible aplicar es de 42.

El diseño de la cámara de tratamiento es un factor que condiciona la distribución del campo eléctrico en la zona de tratamiento y, por tanto, la uniformidad del tratamiento de PEAV aplicado. Por ello, se ha evaluado la homogeneidad del campo eléctrico en la cámara de electrodos paralelos utilizada en los tratamientos en flujo continuo con el software Comsol Multiphysics<sup>®</sup> (Comsol, Estocolmo, Suecia) que permite realizar cálculos de simulación numérica mediante el método de elementos finitos (MEF) (Figura 2.4).

### 2.2.3 Configuración del equipo para el tratamiento en flujo continuo.

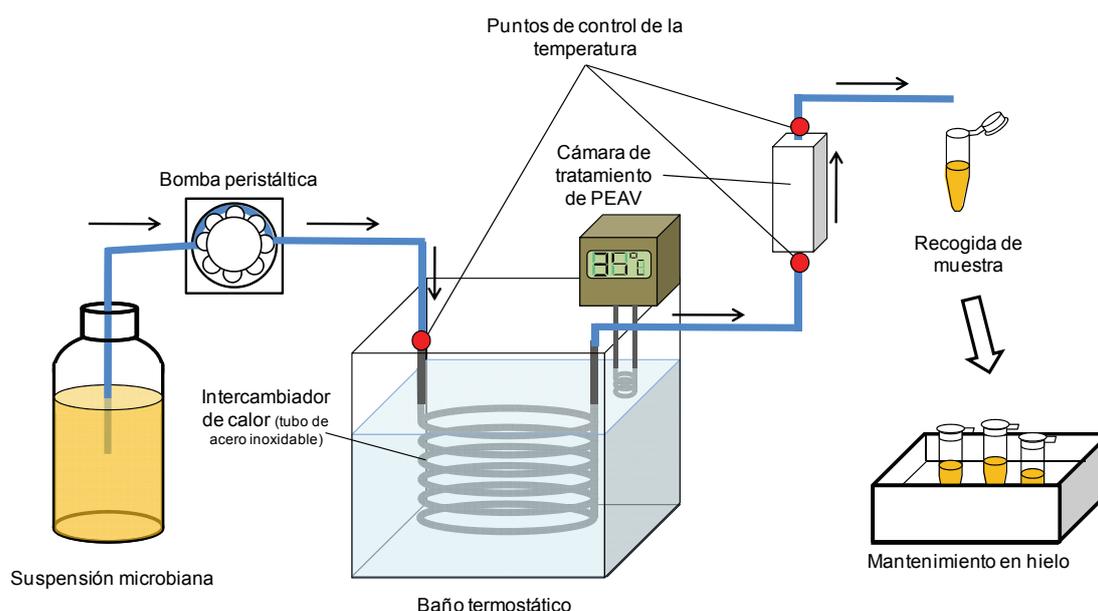
La instalación para la aplicación de los tratamientos de PEAV en flujo continuo consistió en un depósito de 2 L que contenía el medio de tratamiento (zumo de manzana), una bomba, un intercambiador de calor y la cámara de tratamiento (Figura



**Figura 2.4.** Simulación numérica de la distribución del campo eléctrico (kV/cm) en la cámara de tratamiento utilizada en esta investigación (corte transversal) (A) y estimación de la intensidad del campo eléctrico (B) entre los puntos I y II durante la aplicación de un pulso de 3  $\mu$ s de anchura y de 15 kV de amplitud.

2.5). Una bomba peristáltica de ocho cabezales (Ismatec, Glattbrugg, Suiza) impulsaba el medio de tratamiento hacia el intercambiador de calor a través de un tubo de silicona de 3 mm de diámetro interno. El intercambiador de calor consistió en un tubo en espiral de acero inoxidable ( $\varnothing_{\text{interno}}$  2 mm,  $\varnothing_{\text{externo}}$  3mm, 230 cm longitud) sumergido en un baño termostático (modelo K12-mpc-NR, Huber, Offenburg, Alemania). Una vez atravesado el intercambiador, el producto atemperado circulaba hacia la cámara donde recibía el correspondiente tratamiento PEAV. El producto tratado se recogía inmediatamente en tubos Eppendorf estériles que se introducían en hielo.

La temperatura del medio de tratamiento se medía con sondas termopar tipo “K” (Testo GmbH, Lenzkirch, Alemania) colocadas a la entrada del intercambiador de calor y a la entrada y salida de la cámara de tratamiento, como se muestra en la Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Esquema de la instalación para aplicar tratamientos de PEAV en flujo continuo.

### 2.3 Incubación y recuento de supervivientes

Tras realizar las correspondientes diluciones decimales de las muestras tratadas, se sembraban 0,1 mL en masa en placas de Petri a las que se les adicionaba TSA+EL. Tras la siembra, los microorganismos se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas para

todas las cepas de *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium y *S. aureus*, y durante 48 horas para las cepas de *L. monocytogenes*. Tiempos más prolongados de incubación no afectaban al número de microorganismos recuperados tras el tratamiento. Todos los estudios se realizaron al menos por duplicado.

## 2.4. Tratamiento estadístico de los datos

### 2.4.1 Desarrollo de modelos matemáticos de inactivación microbiana por PEAV

A partir de los datos obtenidos para un determinado tratamiento de PEAV, se elaboraron las correspondientes gráficas de supervivencia representando el logaritmo decimal de la fracción de supervivientes (número de supervivientes a lo largo del tratamiento dividido por la concentración inicial) frente al tiempo.

Con objeto de estudiar la cinética de inactivación de los microorganismos seleccionados en función de las condiciones de tratamiento, las curvas de supervivencia obtenidas fueron descritas matemáticamente mediante un modelo basado en la distribución de Weibull (50). Este modelo asume la existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana (*modelo primario*). En este caso, se considera que la resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull (50). Las gráficas de supervivencia ajustadas con dicho modelo se describen mediante la siguiente ecuación matemática:

$$(Ec. 2.1) \quad \text{Log}_{10}S(t) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^{\rho}$$

donde  $S(t)$  es la fracción de supervivientes obtenida tras la aplicación de un tiempo de tratamiento  $t$  expresado en  $\mu\text{s}$ ;  $\delta$  y  $\rho$  son los parámetros del modelo. El parámetro  $\delta$ , llamado parámetro de escala, es el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico decimal de la población microbiana. Por su parte, el parámetro  $\rho$ , o parámetro de forma, hace referencia al perfil que presenta la gráfica de supervivencia. Si  $\rho$  es igual a 1, la gráfica de supervivencia es lineal; si es mayor a 1, es convexa; y si

es menor a 1, se considera cóncava. Los valores  $\delta$  y  $\rho$  se determinaron utilizando el ajuste por mínimos cuadrados mediante la función Solver del programa Excel XP (Microsoft Corporation, Seattle, Washington DF, EE.UU.) o con el programa GraphPad PRISM<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.).

Con objeto de estudiar la relación existente entre los parámetros del modelo y la intensidad del campo eléctrico para cada microorganismo y medio de tratamiento estudiado (*modelos secundarios*), se utilizaron modelos polinomiales de superficie respuesta mediante regresión múltiple utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, EE.UU.). Se aplicó el procedimiento de regresión paso a paso hacia atrás, que eliminó del modelo aquellos parámetros que no eran estadísticamente significativos ( $P > 0,05$ ) mediante un análisis de varianza (36).

Para determinar la calidad de los ajustes, se calculó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la raíz del error cuadrático medio (*RECM*), así como el factor de sesgo ( $B_f$ ) y de exactitud ( $A_f$ ) (7).

#### 2.4.2 Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos (cálculo de los parámetros  $R^2$ , *RECM*, factor  $B_f$  y  $A_f$ , el cálculo de los intervalos de confianza para el 95% y los análisis de varianza -  $p=0,05$ ), así como los ajustes de los modelos, fueron llevados a cabo con los programas informáticos Excel XP (Microsoft Corporation, Seattle, Washington DF, EE.UU.), y GraphPad PRISM<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.). El diseño de composición central, el ajuste del modelo obtenido a partir de este diseño, la estimación de los coeficientes y la evaluación del nivel de significancia del modelo se llevaron a cabo mediante el software Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, EE.UU.).

### 3 RESULTADOS

---

#### 3.1 Selección de cepas resistentes a los PEAV

Los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos por PEAV deben definirse para aquellos microorganismos más resistentes a estos tratamientos (35). Estudios realizados por diferentes autores han demostrado que los microorganismos más resistentes a una determinada tecnología de inactivación no tienen por qué ser los más resistentes a otra tecnología. Por ejemplo *Salmonella* Senftenberg 775W es una de las serovariedades más resistentes a los tratamientos térmicos pero, sin embargo, es más sensible a las altas presiones hidrostáticas o a los PEAV que otras serovariedades de *Salmonella* más sensibles al calor (32, 1). Por lo tanto, los microorganismos de referencia para establecer los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos dependerán de la tecnología que se utilice.

La mayoría de las investigaciones publicadas sobre la resistencia microbiana a los PEAV están basadas en estudios realizados con una sola cepa. Los pocos estudios realizados indicaban que las diferencias en resistencia entre cepas podrían ser importantes (27, 10). Por otro lado, era conocido que, además de la resistencia intrínseca del microorganismo a los PEAV, otros factores, como las características del medio de tratamiento o la fase de crecimiento, pueden tener una influencia importante en la sensibilidad de los microorganismos a esta tecnología (6). De entre las características del medio de tratamiento, se ha demostrado que el pH juega un papel decisivo en la resistencia microbiana a los PEAV (18).

A la vista de estos antecedentes, en esta investigación, se comparó la resistencia a los PEAV de cinco cepas de cuatro microorganismos patógenos, dos Gram-positivos - *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*- y dos Gram-negativos -*Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium- con objeto de identificar las cepas de referencia para la

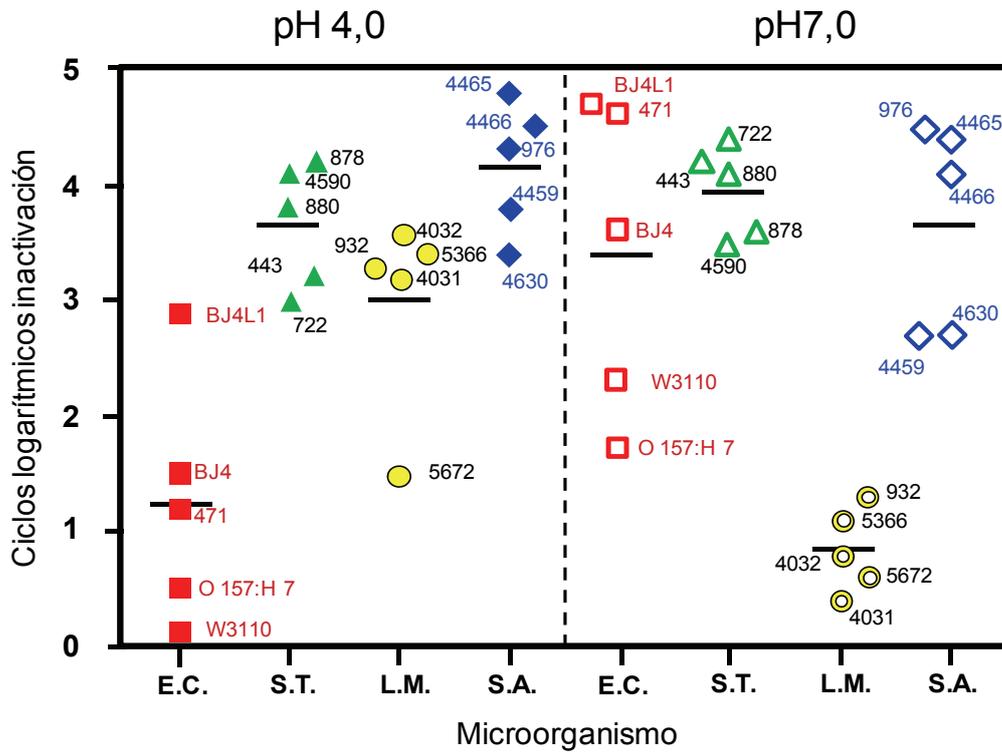
definición de los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos por PEAV. La resistencia a los PEAV se investigó en medios de pH 7,0 y 4,0 con microorganismos en fase de crecimiento estacionario.

En la Figura 3.1, se compara la resistencia de las cinco cepas de cada uno de los cuatro microorganismos patógenos a un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 200  $\mu$ s) en medios de pH 4,0 y 7,0. Cada punto de la gráfica se corresponde con los ciclos logarítmicos de inactivación obtenidos para cada una de las cepas, mientras que la línea horizontal representa el valor medio de los ciclos de inactivación obtenidos en las cinco cepas de cada uno de los microorganismos.

Como se puede observar, la resistencia a los PEAV varió considerablemente entre las cinco cepas de *E. coli* investigadas. En todos los casos, la resistencia individual de cada cepa fue mayor en el medio de pH 4,0 que en el medio de pH 7,0. En el medio de pH 4,0 se alcanzó una máxima inactivación de alrededor de 3 ciclos logarítmicos en la cepa más sensible, mientras que el tratamiento aplicado no afectó a la viabilidad de la cepa más resistente. Por otra parte, en el medio de pH 7,0 la inactivación de la población de la cepa más resistente fue de 1,7 ciclos logarítmicos y la de la más sensible de 4,7 ciclos logarítmicos. Independientemente del pH del medio de tratamiento, las cepas de *E. coli* W3110 y O157:H7 fueron las más resistentes al tratamiento, mientras que la más sensible fue la cepa de *E. coli* BJ4L1. Esta última cepa es una cepa mutada que carece del factor sigma (*rpoS*) de fase estacionaria, al que se le atribuye la responsabilidad de que las células aumenten su resistencia cuando se encuentran en fase estacionaria de crecimiento (26).

En el caso de las cepas de *Salmonella* Typhimurium, éstas fueron en su conjunto más sensibles al tratamiento que las del otro microorganismo Gram-negativo investigado -*E. coli*- en ambos medios de tratamiento. Además, la variabilidad en la

**Figura 3.1.** Comparación de la resistencia a los PEAV de las cepas investigadas en medios de pH 4,0 y pH 7,0 . E.C.: *Escherichia coli* (■;□), S.T.: *Salmonella* Typhimurium (▲;△), L.M.: *Listeria monocytogenes* (●;○), S.A.: *Staphylococcus aureus* (◆;◇). Las líneas horizontales representan la inactivación media entre las cinco cepas de cada microorganismo. Condiciones de tratamiento: 30 kV/cm, 200 μs.



resistencia entre las cinco cepas fue menor que entre las cepas de *E. coli*. El pH del medio de tratamiento apenas afectó a la resistencia de las cepas de este microorganismo. En ambos medios, el tratamiento inactivó entre 3 y 4 ciclos logarítmicos la población de las cinco cepas investigadas. Por otro lado, las cepas más resistentes al tratamiento en medio de pH ácido no son necesariamente también las más resistentes en pH neutro. Las cepas de *Salmonella* Typhimurium más resistentes al tratamiento de PEAV aplicado en tampón de pH 4,0 fueron la 443 y la 722, las cuales fueron las más sensibles a pH 7,0.

Por lo que respecta a los microorganismos Gram-positivos, en el caso de *L. monocytogenes*, 4 de las 5 cepas investigadas presentaban una resistencia similar en el medio de pH 4,0 (alrededor de 3,5 ciclos de inactivación) mientras que la cepa 5672 fue la más resistente en este medio (1,2 ciclos de inactivación). Las cinco cepas de *L. monocytogenes* fueron extraordinariamente resistentes en el medio de pH 7,0. La máxima inactivación obtenida en la cepa más sensible fue de 1,2 ciclos logarítmicos.

Las cepas de *S. aureus* fueron más sensibles que las cepas de *L. monocytogenes* al tratamiento de PEAV. La resistencia de las cinco cepas de *S. aureus* varió considerablemente en ambos medios de tratamiento. En el medio de pH 4,0, la inactivación entre las cepas más resistente y más sensible varió entre 3,5 y 5 ciclos logarítmicos, mientras que en el medio de pH 7,0 varió entre 2,5 y 4,5 ciclos.

En conclusión, las cepas más resistentes en el medio de pH 4,0 fueron las cepas de *E. coli* W3110 y O157:H7 y en el medio de pH 7,0 las cepas de *L. monocytogenes* 4031 y 5672. Por lo tanto, este estudio confirma resultados obtenidos por otros autores sobre la influencia del pH en la resistencia microbiana a los PEAV según los cuales la flora Gram-positiva es más resistente en los medios de pH neutro, y la flora Gram-negativa lo es en los medios de pH ácido (18). Desde un punto de vista práctico, estos resultados indican que, en función del pH del alimento, el microorganismo más resistente que ha de utilizarse como referencia para establecer los criterios de procesado puede ser diferente y probablemente se corresponderá con un microorganismo Gram-positivo en los medios de pH neutro y con un microorganismo Gram-negativo en los medios de pH ácido.

Con objeto de obtener datos cinéticos sobre la inactivación microbiana por PEAV de las cepas resistentes a los tratamientos, para poder desarrollar modelos matemáticos que permitan establecer los criterios de procesado, se seleccionaron, considerando el nivel de inactivación obtenido, así como el daño subletal generado por los tratamientos de PEAV descritos, las cepas más resistentes de cada uno de los cuatro microorganismos investigados, que fueron *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium 878.

### 3.2 Modelización de la inactivación microbiana de las cepas resistentes a los PEAV.

Como se ha indicado anteriormente, el objetivo de la pasteurización es reducir la población de los microorganismos patógenos que puede vehicular el alimento a un nivel que no suponga un riesgo para la salud del consumidor. El número de ciclos logarítmicos que es necesario reducir la población microbiana dependerá de la concentración a la que habitualmente se encuentre este microorganismo en la materia prima considerando las posibles variaciones que pueda haber en la concentración del microorganismo y del denominado *Objetivo de Seguridad Alimentaria* (del inglés, *Food Safety Objective*, FSO) (22). Este objetivo de seguridad alimentaria lo deberían establecer las agencias regulatorias basándose en la dosis infectiva del microorganismo de referencia. Con la finalidad de posibilitar que los responsables de la gestión de riesgos puedan transmitir eficazmente objetivos precisos de seguridad alimentaria a la industria y a las empresas relacionadas con el sector, se han definido otros conceptos como los Criterios del Resultado, del Proceso y del Producto, que son necesarios considerar en el desarrollo de procesos de pasteurización por nuevas tecnologías de procesado.

Se denomina *Criterios del Resultado* (del inglés, *Performance Criterion*) a los ciclos logarítmicos que es necesario reducir la población del microorganismo de referencia (22). Un ejemplo de criterios del resultado es el requerimiento establecido por la FDA para la pasteurización de zumos de frutas, consistente en reducir cinco ciclos logarítmicos la población de los microorganismos patógenos más resistentes que puedan vehicular estos alimentos (16). La legislación europea no indica las reducciones decimales que se deben conseguir en los microorganismos de referencia, sino que lo que generalmente indica es que el producto tiene que estar libre de microorganismos patógenos o la máxima concentración permitida de estos microorganismos al final del

período de su vida útil. En cualquier caso, es necesario aplicar unas condiciones de tratamiento que permitan conseguir los criterios establecidos por las agencias regulatorias. A estas condiciones de tratamiento se les denomina *Criterios del Proceso* (del inglés, *Process Criterion*) (22).

El desarrollo de modelos matemáticos predictivos es una herramienta muy útil para el diseño de tratamientos de pasteurización por PEAV. La obtención de expresiones matemáticas capaces de predecir la inactivación de diferentes microorganismos en un amplio rango de condiciones experimentales permite identificar el microorganismo más resistente con el cual establecer las condiciones de tratamiento que se deben aplicar (criterios del proceso) para conseguir el nivel de inactivación deseado (criterios del resultado).

El desarrollo de modelos matemáticos predictivos para estimar la inactivación microbiana requiere, en primer lugar, la obtención de las denominadas gráficas de supervivencia a partir de la representación del número de microorganismos supervivientes a lo largo del tiempo para distintos parámetros de procesado y condiciones del medio de tratamiento. Estas gráficas de supervivencia se describen mediante los denominados modelos primarios. A continuación, se obtienen las expresiones matemáticas que describan la relación entre los parámetros de los modelos primarios y los parámetros de procesado y las condiciones medioambientales, denominadas modelos secundarios. Finalmente, la combinación de los modelos primarios y secundarios permite obtener los modelos finales o terciarios, capaces de estimar la inactivación microbiana en todo el rango de condiciones experimentales utilizadas para la obtención de los modelos (30).

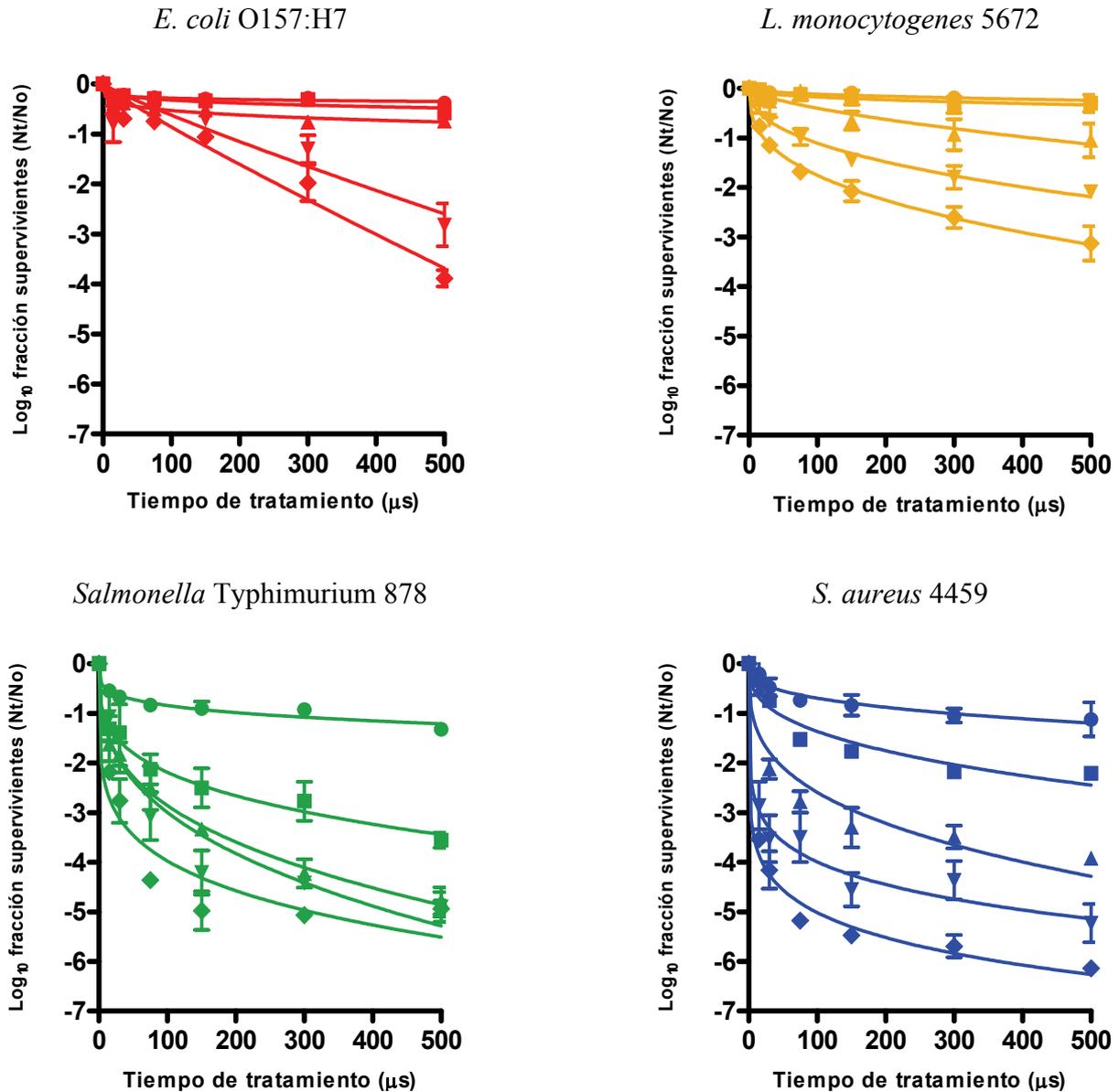
En la Figura 3.2, se muestra, a modo de ejemplo, algunas de las gráficas de supervivencia obtenidas para los cuatro cepas de cada uno de los microorganismos

investigados más resistentes a los PEAV. Como se observa, la cinética de inactivación microbiana por PEAV no seguía la tradicional cinética de primer orden. Es decir, no había una relación lineal entre el logaritmo de la fracción de supervivientes y el tiempo de tratamiento. Al igual que han observado otros autores, las gráficas de supervivencia obtenidas eran cóncavas (24, 41, 38). Este tipo de gráficas de supervivencia podría ser debido a la existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana de modo que la primera parte de la curva, donde la velocidad de inactivación es más rápida, refleja la muerte de los microorganismos más sensibles al tratamiento y, la segunda parte, donde la inactivación es más lenta, la muerte de los más resistentes. Una distribución heterogénea del campo eléctrico en la cámara de tratamiento o fenómenos de adaptación de los microorganismos al tratamiento también podrían explicar esta forma de las gráficas de supervivencia.

Para describir estas gráficas de supervivencia, se utilizó un modelo matemático basado en la distribución de Weibull. En la Figura 3.2, donde los puntos se corresponden con los valores experimentales y las líneas con el ajuste del modelo a estos valores, se muestra cómo este modelo describe adecuadamente las gráficas de supervivencia de los 4 microorganismos investigados.

En la Tabla 3.1 se muestran los modelos secundarios desarrollados para cada uno de los microorganismos que relacionan los parámetros del modelo de Weibull ( $\rho$  y  $\delta$ ) con las condiciones de tratamiento investigadas (intensidad de campo eléctrico  $-E$ - y pH del medio de tratamiento  $-pH$ ). Estos modelos secundarios se obtuvieron utilizando técnicas de regresión múltiple. Aunque es deseable que los modelos matemáticos que describen el comportamiento de los microorganismos sean lo más sencillos posibles (52), su complejidad suele ser mayor cuanto mayor es el número de factores y el rango de condiciones experimentales considerados. Con objeto de poder estimar la

**Figura 3.2.** Influencia de la intensidad de campo eléctrico y del tiempo de tratamiento en la inactivación de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 5672, *Salmonella* Typhimurium 878 y *S. aureus* 4459 tratados por PEAV en medio de pH 3.5. Las líneas se corresponden con el ajuste del modelo estimado para cada uno de los microorganismos. Intensidades de campo eléctrico: 15 kV/cm (●), 20 kV/cm (■), 25 kV/cm (▲), 30 kV/cm (▼) y 35 kV/cm (◆); tampón McIlvaine pH 3,5 y conductividad 1 mS/cm; frecuencia: 1 Hz.



inactivación de los cuatro microorganismos investigados en función del campo eléctrico, del tiempo de tratamiento y del pH del medio de tratamiento, fue necesario obtener los correspondientes modelos terciarios, sustituyendo en la ecuación del modelo de Weibull, los parámetros  $\rho$  y  $\delta$  por las correspondientes expresiones de los modelos secundarios mostrados en la Tabla 3.1. La complejidad de las expresiones matemáticas obtenidas en estos modelos terciarios requiere el desarrollo de sencillas aplicaciones informáticas, que se pueden realizar mediante programas informáticos bien conocidos

**Tabla 3.1.** Expresiones matemáticas para los parámetros de forma ( $\rho$ ) y escala ( $\delta$ ) de los modelos matemáticos basados en la distribución de Weibull, correspondientes a cada microorganismo estudiado.

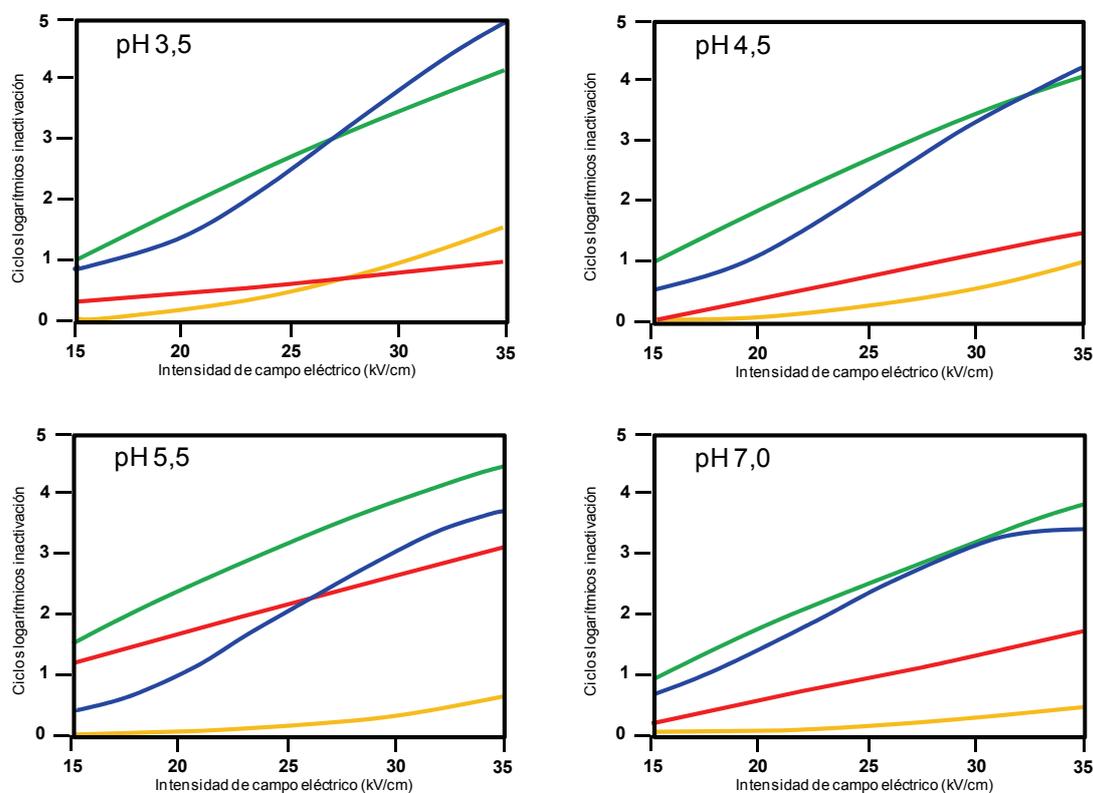
Microorganismo	Modelos secundarios
<i>E. coli</i> O157:H7 (Ec. 3.1)	$\rho = 1,3084 - 0,0419 \cdot \text{pH}^2 + 0,0013 \cdot e^{\text{pH}}$ $\text{Log}_{10} \delta = -42,0281 + 0,4589 \cdot E + 31,7855 \cdot \text{pH} - 6,0850 \cdot \text{pH}^2 - 0,000253 \cdot E^3 + 0,3657 \cdot \text{pH}^3 - 0,5131 \cdot E \cdot \text{pH} + 0,00966 \cdot E^2 \cdot \text{pH} + 0,0519 \cdot E \cdot \text{pH}^2 - 0,00096 \cdot E^2 \cdot \text{pH}^2$
<i>Salmonella</i>	$\rho = 0,2422$
Typhimurium 878 (Ec. 3.2)	$\text{Log}_{10} \delta = 8,08 - 0,407 \cdot E - 0,517 \cdot \text{pH} + 0,00535 \cdot E^2 + 0,038 \cdot \text{pH}^2 + 0,00421 \cdot E \cdot \text{pH}$
<i>L. monocytogenes</i> 5672 (Ec. 3.3)	$\rho = 0,408 + 0,302 \cdot e^{-2(-4,872 \cdot \text{pH} + 23,162)}$ $\text{Log}_{10} \delta = 6,94 - 0,25 \cdot E - 0,07 \cdot \text{pH}^2 + 0,03 \cdot E \cdot \text{pH}$
<i>S. aureus</i> 4459 (Ec. 3.4)	$\rho = 0,959 + 1,267 \cdot e^{-2(-1,183 \cdot \text{pH} + 4,337)}$ $\text{Log}_{10} \delta = -4,33 + 4,86 \cdot \text{pH} - 0,48 \cdot \text{pH}^2 - 0,15 \cdot E \cdot \text{pH} + 0,0014 \cdot E^2 \cdot \text{pH} + 0,0092 \cdot E \cdot \text{pH}^2$

E: intensidad de campo eléctrico (kV/cm) pH: pH del medio t: tiempo de tratamiento ( $\mu\text{s}$ )

como Excel, para facilitar el uso de estos modelos a los potenciales usuarios de los mismos, como podría n ser los técnicos de las empresas alimentarias.

Los modelos matemáticos permiten comparar la resistencia microbiana en un amplio rango de condiciones experimentales, o establecer las condiciones de tratamiento para conseguir un determinado nivel de inactivación en función de las características del medio de tratamiento (30). Por ejemplo, en la Figura 3.3, se compara la resistencia de las cuatro cepas resistentes de los cuatro microorganismos investigados en medios de distinto pH en un rango de intensidades del campo eléctrico comprendido entre 15 y 35 kV/cm a un tiempo de tratamiento de 100  $\mu\text{s}$ . El criterio utilizado para elegir este tiempo de tratamiento fue comparar la resistencia a unas condiciones aplicables en la práctica industrial en un proceso en flujo continuo. Muchos estudios sobre la resistencia de los microorganismos a los PEAV en cámaras de tratamiento estáticas se han realizado aplicando tiempos de tratamiento mucho más largos que los que se podrían aplicar en la práctica a escala industrial en un proceso en flujo continuo. Los resultados

**Figura 3.3.** Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la inactivación estimada para *E. coli* O157:H7 (líneas rojas), *Salmonella* Typhimurium 878 (líneas verdes), *L. monocytogenes* 5672 (líneas naranjas) y *S. aureus* 4459 (líneas azules) tras tratamientos de PEAV de 100  $\mu$ s, en medios de pH de 3,5, 4,5, 5,5 y 7,0, a partir de las ecuaciones 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 respectivamente.



obtenidos al comparar la resistencia de las cuatro cepas más resistentes de cada uno de los microorganismos patógenos estudiados, en un amplio rango de condiciones experimentales, a partir de los modelos matemáticos desarrollados confirmaron prácticamente aquellos resultados obtenidos previamente cuando se comparó la resistencia de las 20 cepas en medios de pH 7,0 y 4,0 a una intensidad de campo eléctrico de 30 kV/cm. En todas las condiciones de tratamiento investigadas, *L. monocytogenes* 5672 y *E. coli* O157:H7, salvo en el medio de pH 5,5, fueron las cepas más resistentes a los tratamientos de PEAV. Sin embargo, el máximo nivel de inactivación obtenido en estas cepas resistentes, en condiciones aplicables en la práctica en tratamientos en flujo continuo, no superaba un ciclo logarítmico. Esta inactivación es insuficiente para garantizar que los alimentos estén libres de microorganismos patógenos. Por lo tanto, para definir los criterios de procesado que permitan conseguir

un nivel suficiente de inactivación para pasteurizar los alimentos por PEAV, es necesario combinar esta tecnología con otros factores con objeto de incrementar la letalidad de los tratamientos.

### **3.3 Desarrollo de procesos combinados con los PEAV para establecer parámetros de procesado eficaces para la pasteurización de los alimentos.**

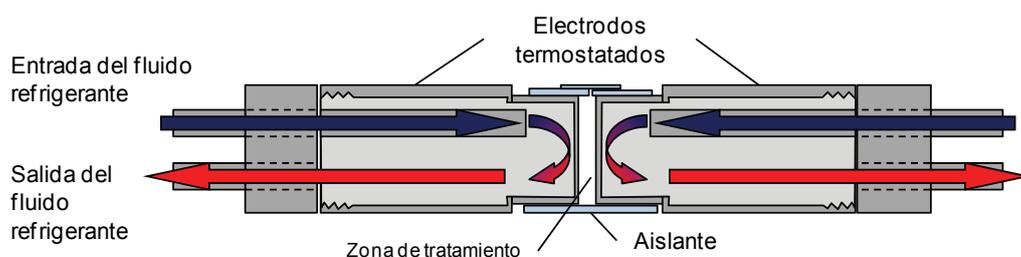
La conservación de los alimentos por procesos combinados tiene como objetivo combinar varios factores que afecten a la viabilidad y/o supervivencia microbiana con el fin de conseguir prolongar la vida útil y garantizar la seguridad de los alimentos, afectando lo menos posible a sus propiedades sensoriales y nutritivas (40). Generalmente, la combinación de factores persigue reducir la intensidad con las que éstos se aplican para conseguir el efecto deseado sin que se vean alteradas las características del alimento. Sin embargo, en el caso de nuevas tecnologías de inactivación microbiana, como las altas presiones hidrostáticas o los PEAV, también se ha considerado combinar distintos factores con el objetivo de conseguir un nivel de inactivación suficiente para garantizar la seguridad de los alimentos a intensidades de tratamiento aplicables a escala industrial (3). Las combinaciones más investigadas para conseguir este segundo objetivo han consistido en la aplicación de estas nuevas tecnologías a temperaturas moderadas y/o en presencia de agentes antimicrobianos.

### **3.4. Influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV**

Los resultados publicados indican que la inactivación microbiana por PEAV aumenta al incrementar la temperatura de tratamiento, aunque las temperaturas a las que se apliquen los PEAV no sean letales para los microorganismos (20). Este efecto se ha atribuido al incremento la fluidez de la bicapa de fosfolípidos de las membranas

celulares por la temperatura sensibilizándola a los fenómenos de electroporación (25). La mayoría de los estudios publicados sobre la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV han sido realizados en cámaras de tratamiento en flujo continuo (20, 44, 5). En este tipo de estudios, generalmente se modifica la temperatura de entrada del medio de tratamiento a la cámara de procesado, mientras que la temperatura de salida varía en función de la energía eléctrica disipada durante el tratamiento de PEAV por lo que la temperatura de tratamiento no es constante.

Con objeto de comprender mejor la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV, se diseñó, construyó y evaluó una cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos termostatados, que permitieron obtener por primera vez datos cinéticos de inactivación microbiana por PEAV en un amplio rango de temperaturas (4-50°C) en condiciones prácticamente isotérmicas. En la Figura 3.4, se muestra un esquema de la cámara diseñada para este propósito. Como se observa, la cámara de tratamiento consta de dos electrodos de acero inoxidable, a través de los cuales se hace circular un líquido no conductor de la electricidad, que se puede atemperar a diferentes temperaturas. La temperatura a la que se hace circular este fluido depende de la temperatura a la que se quiera investigar la inactivación microbiana. El calor generado por la aplicación del tratamiento es retirado por el fluido, que continuamente está circulando a través de los electrodos.



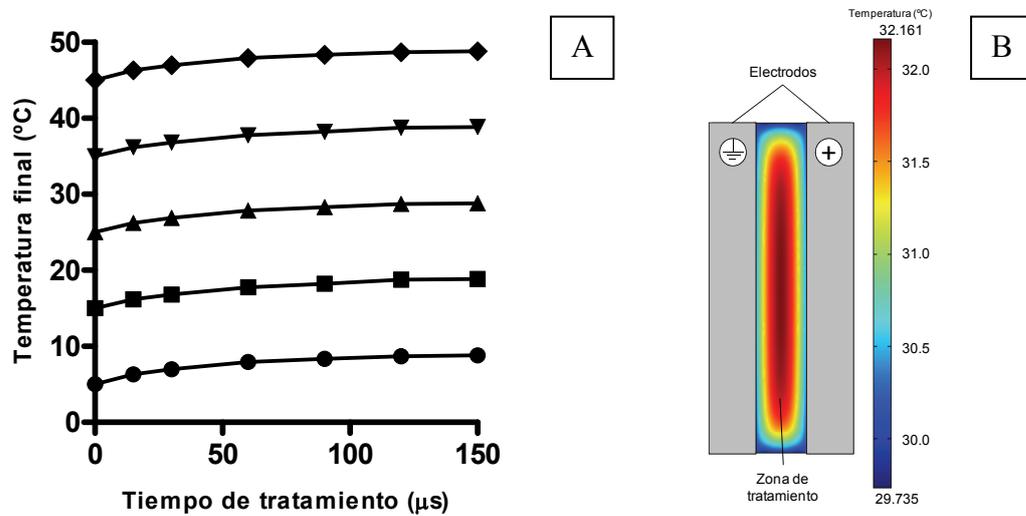
**Figura 3.4.** Esquema de la cámara de tratamiento estática con electrodos paralelos termostatados. Las flechas indican la dirección y el sentido del flujo del aceite dieléctrico por el interior de los electrodos. Separación entre electrodos: 2,5 mm; longitud del electrodo: 40,0 mm; diámetro del electrodo: 16,0 mm.

En la Figura 3.5A, se muestra la evolución de la temperatura en el interior de la cámara de tratamiento durante la aplicación de un tratamiento de PEAV a distintas temperaturas iniciales. Como se observa, tras la aplicación de un tratamiento tan intenso como 50 pulsos de 3  $\mu$ s a una intensidad de campo eléctrico de 30 kV/cm, la temperatura final nunca se incrementó en más de 4°C. La Figura 3.5B muestra la distribución de la temperatura estimada por técnicas de simulación numérica, en la cámara de tratamiento tras aplicar el tratamiento de PEAV anterior, a un medio en el que la temperatura inicial era 28,0°C. La temperatura osciló desde 29,7°C en el punto más frío a 32,1°C en el punto más caliente.

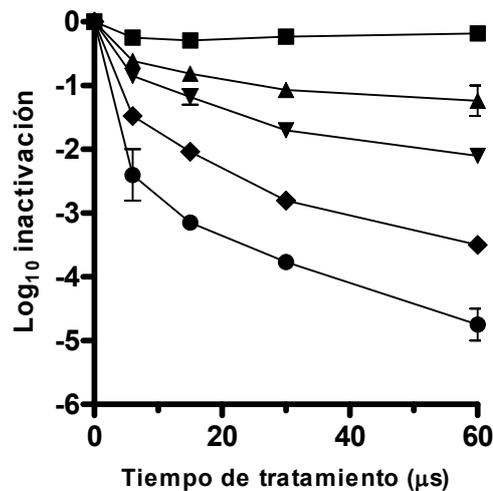
Los datos obtenidos utilizando esta cámara de tratamiento demostraron que la temperatura de tratamiento tiene un efecto muy importante en la resistencia microbiana a los PEAV. La Figura 3.6 muestra la influencia de la temperatura de tratamiento en la resistencia de *Salmonella* Typhimurium 878 a los PEAV. Se observa que el incremento de la temperatura de tratamiento de 4 a 50°C aumentó la letalidad de un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 60  $\mu$ s) desde menos de 0,5 a 5 ciclos logarítmicos en un medio de pH 3,5. Por lo tanto, si el tratamiento se aplica a temperaturas superiores a la temperatura ambiente (50°C) se podría conseguir un nivel de inactivación en la cepa de *Salmonella* Typhimurium 878 resistente a los PEAV suficiente para garantizar la seguridad microbiológica del producto con un tiempo de tratamiento de 60  $\mu$ s. inferior a los que se utilizaron para comparar la resistencia de las cuatro cepas en la Figura 3.3.

Los resultados obtenidos con la cámara de tratamiento termostataada indican que la inactivación microbiana por PEAV depende en gran medida de la temperatura de tratamiento, incluso aunque ésta no sea letal para los microorganismos. La aplicación de tratamientos de PEAV a temperaturas superiores a la temperatura ambiente podría ser una estrategia apropiada para conseguir niveles de inactivación suficientes para

**Figura 3.5.** (A) Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a temperaturas iniciales de 5°C (●), 15°C (■), 25°C (▲), 35°C (▼) y 45°C (◆) utilizando la cámara de electrodos termostatados. Condiciones de tratamiento: 30kV/cm; 0,5 Hz, anchura de pulso de 3 μs. (B) Representación de la temperatura estimada mediante simulación numérica dentro de la cámara de tratamiento con electrodos termostatados, tras aplicar un tratamiento de PEAV de 50 pulsos de onda cuadrada de 3 μs a 30 kV/cm. Temperatura inicial: 28°C.



garantizar la seguridad de los alimentos con tratamientos aplicables desde un punto de vista industrial. En definitiva, se ha demostrado que la temperatura es un parámetro crítico que define los tratamientos por PEAV y que debería de incluirse en los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos mediante la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje.



**Figura 3.6.** Gráficas de supervivencia correspondientes a la inactivación de *Salmonella Typhimurium* 878 por PEAV (30 kV/cm, 0.5 Hz, pulsos de onda cuadrada de 3 μs) a diferentes temperaturas (4°C (■), 15°C (▲), 27°C (▼), 38°C (◆) y 50°C (●)) en tampón McIlvaine de pH 3.5.

### 3.5. Combinación de tratamientos de PEAV con antimicrobianos

Se había demostrado que la combinación de PEAV con distintos antimicrobianos, como nisina, lisozima, pediocina AcH o ácidos orgánicos es una estrategia eficaz para aumentar la eficacia letal de los tratamientos por PEAV (17, 46, 34). Sin embargo, no existía información sobre la influencia de estos antimicrobianos en el efecto letal de los PEAV a distintas temperaturas en medios de distinto pH. Con objeto de evaluar la posibilidad de utilizar compuestos antimicrobianos para mejorar la letalidad de los tratamientos por PEAV, se investigó la inactivación de las cuatro cepas de microorganismos patógenos seleccionadas en presencia de nisina (100 y 200 ppm), en el rango de pH de la mayoría de los alimentos (3,5-7,0), a distintas temperaturas (4-50°C).

De entre los posibles antimicrobianos que podrían haberse investigado, se eligió la bacteriocina *nisina*, cuyo mecanismo de acción es similar al de los PEAV. La nisina es un péptido producido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que se caracteriza porque se une a la membrana citoplasmática de los microorganismos provocando la formación de poros y la salida del contenido intracelular (12). Aunque es conocido que la nisina no es efectiva frente a microorganismos Gram-negativos, debido a que su membrana externa impide la acción de la nisina sobre la membrana citoplasmática, algunos autores habían indicado que la combinación de PEAV y nisina era también efectiva en microorganismos Gram-negativos (28).

Debido a que el número de factores que se quería investigar era muy elevado, se recurrió a técnicas de diseño experimental para la planificación de los experimentos. Estas técnicas permiten establecer las condiciones experimentales necesarias para obtener el mínimo número de datos necesarios para la realización de análisis estadísticos que permitan obtener conclusiones válidas y objetivas.

En la Tabla 3.2, se muestran los modelos matemáticos obtenidos que estiman la inactivación microbiana que se obtiene con un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99  $\mu$ s) en función de la temperatura ( $T$ ), del pH del medio de tratamiento ( $pH$ ) y de la concentración de nisina ( $Nis$ ). En todos los microorganismos, la relación entre la inactivación microbiana y los factores investigados se describe mediante ecuaciones polinomiales de segundo orden. La aparición de términos elevados al cuadrado indican que el incremento de la inactivación al modificar la concentración de nisina en el caso de *L. monocytogenes* 5672 o el pH en el caso de *S. aureus* 4459 no es lineal, mientras que la aparición de un término donde se multiplican dos factores indica que hay una interacción entre ellos, es decir, que la influencia de uno de ellos depende del valor que tiene el otro factor. Por otra parte, la ausencia del término nisina en las expresiones obtenidas para los dos microorganismos Gram-negativos revela que la presencia de nisina no influye de manera significativa en el efecto letal de los PEAV a distintas temperaturas en medios de distinto pH. Esto indicaría que, incluso a temperaturas de 50°C, la membrana externa de los microorganismos Gram-negativos no se ve afectada por los tratamientos de PEAV. Estos resultados están en contradicción con los obtenidos por algunos autores que señalan que la presencia de nisina incrementa el efecto letal de los pulsos eléctricos en algunos microorganismos Gram-negativos como *E. coli* o *Salmonella* (8, 47, 31). Este diferente comportamiento podría ser debido a que se han utilizado otras cepas distintas de las investigadas en nuestro estudio o a que, como consecuencia del tratamiento de PEAV, se han alcanzado temperaturas superiores a los 50°C, que podrían afectar a la membrana externa y permitir que la nisina accediera a la membrana citoplasmática de los microorganismos Gram-negativos.

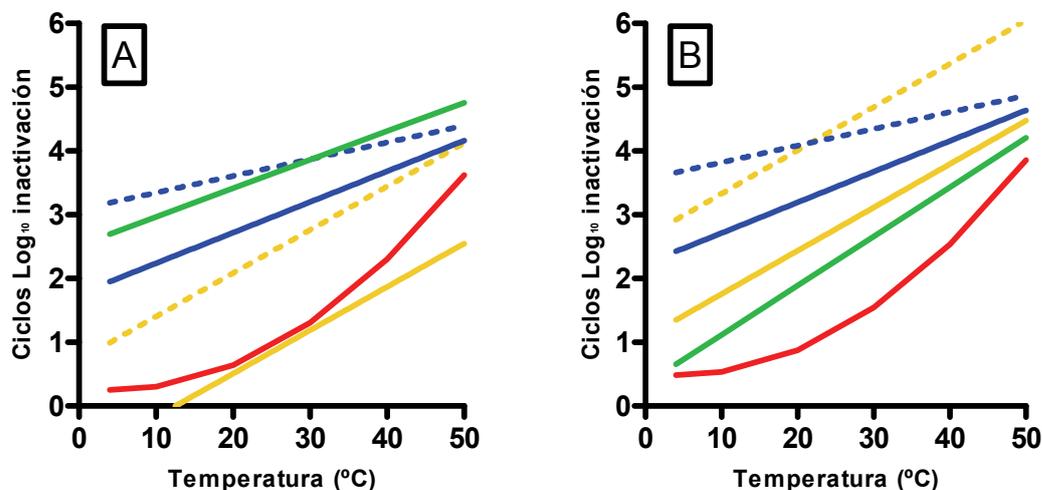
**Tabla 3.2.** Modelos matemáticos desarrollados para estimar la inactivación en los microorganismos investigados tras un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99  $\mu$ s) en función de la temperatura (entre 4 y 50°C), el pH del medio (entre 3,5 y 7,0) y la presencia de nisina (hasta 200 ppm).

Microorganismo	Modelo matemático
<i>E. coli</i> O157:H7 (Ec. 3.5)	$\text{Log S} = -12,84 - 0,015 \cdot T + 5,76 \cdot \text{pH} + 0,002 \cdot T^2 - 0,55 \cdot \text{pH}^2$
<i>Salmonella</i> Typhimurium 878 (Ec. 3.6)	$\text{Log S} = -10,33 + 0,11 \cdot T + 4,27 \cdot \text{pH} - 0,35 \cdot \text{pH}^2 - 0,009 \cdot T \cdot \text{pH}$
<i>L. monocytogenes</i> 5672 (Ec. 3.7)	$\text{Log S} = 3,01 + 0,07 \cdot T + 0,55 \cdot \text{pH} + 0,02 \cdot \text{Nis} - 0,000051 \cdot \text{Nis}^2$
<i>S. aureus</i> 4459 (Ec. 3.8)	$\text{Log S} = 0,03 + 0,05 \cdot T - 1,01 \cdot \text{pH} + 0,0066 \cdot \text{Nis} - 0,12 \cdot \text{pH}^2 + 0,00011 \cdot T \cdot \text{Nis}$

S: fracción de supervivientes, T: Temperatura de tratamiento (°C) pH: pH del medio de tratamiento  
Nis: Concentración de nisina (ppm)

Los modelos desarrollados permitieron comparar la resistencia de las cuatro cepas resistentes de los microorganismos patógenos investigados tras un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99  $\mu$ s) en medios de distinto pH, pero, además, a distintas temperaturas y cuando la nisina estaba presente en el medio de tratamiento. A modo de ejemplo, en la Figura 3.7, se muestra el número de ciclos de inactivación que se consiguen al aplicar el tratamiento de PEAV seleccionado a distintas temperaturas en medios de pH 3,5 y 7,0 sin nisina o en presencia de 100 ppm de nisina. Como la presencia de nisina no afectó a la sensibilidad de las células Gram-negativas, en ambas gráficas, para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium 878 sólo se muestran las líneas correspondientes a su inactivación sin nisina. Se observa que, independientemente del pH o de la presencia de nisina, había una relación lineal entre la temperatura de tratamiento y los ciclos de inactivación conseguidos en todos los microorganismos, salvo en *E. coli* O157:H7. Este comportamiento ya se podría deducir de las ecuaciones mostradas en la Tabla 3.2 ya que sólo en la ecuación de *E. coli* O157:H7 aparece el término temperatura elevado al cuadrado.

**Figura 3.7.** Influencia de la temperatura y la presencia (líneas discontinuas) o ausencia (líneas continuas) de nisina (100 ppm) en la inactivación estimada por los modelos matemáticos desarrollados para *E. coli* O157:H7 (EC. 3.5) (rojo), *Salmonella* Typhimurium 878 (Ec. 3.6) (verde), *L. monocytogenes* 5672 (Ec. 3.7) (naranja) y *S. aureus* 4459 (Ec. 3.8) (azule) tras un tratamiento de PEAV (30kV/cm, 99  $\mu$ s) en tampón de pH 7,0 (A) y 3,5 (B).



En el medio de pH 7,0, cuando no se añadió nisina al medio de tratamiento en todo el rango de temperaturas investigado, las cepas de *Salmonella* Typhimurium 878 y *S. aureus* 4459 fueron las más sensibles al tratamiento, mientras que la más resistente fue la cepa de *L. monocytogenes* 5672. El incremento de la temperatura de tratamiento de 25°C, hasta 50°C aumentó el efecto letal del tratamiento entre 1 y 2 ciclos logarítmicos dependiendo del microorganismo. La presencia de nisina aumentó el efecto letal del tratamiento en los dos microorganismos Gram-positivos, especialmente en *L. monocytogenes* 5672. En este microorganismo, la presencia de 100 ppm de nisina incrementó el efecto letal del tratamiento alrededor de 1,5 ciclos logarítmicos para todas las temperaturas y a todos los pH investigados. Debido al aumento de la sensibilidad a los PEAV de los microorganismos Gram-positivos, cuando se añadió nisina al medio de tratamiento, el microorganismo más resistente a los PEAV fue la cepa de *E. coli* O157:H7.

En el medio de pH 3,5, en ausencia de nisina, las cepas más resistentes al tratamiento en todo el rango de temperaturas fueron las de los microorganismos Gram-

negativos. El incremento de la resistencia a los PEAV de los microorganismos Gram-negativos y de la sensibilidad a los PEAV de los microorganismos Gram-positivos al disminuir el pH del medio de tratamiento ha sido observado previamente (19). Sin embargo, por primera vez, nuestros resultados muestran que este efecto es independiente de la temperatura de tratamiento (Figura 3.7). Hay que destacar que en el medio de pH 3,5, cuando se aplicó el tratamiento a 50°C la resistencia de las 4 cepas fue similar, en todos los casos la inactivación obtenida fue de entre 3,5 y 4,5 ciclos logarítmicos. La presencia de nisina también incrementó el efecto letal de los PEAV en la flora Gram-positiva en el medio de pH 3,5. A la temperatura más alta investigada (50°C), y en presencia de 100 ppm de nisina, se inactivaron 4,5 y 6 ciclos logarítmicos respectivamente la población de *S. aureus* 4459 y *L. monocytogenes* 5672.

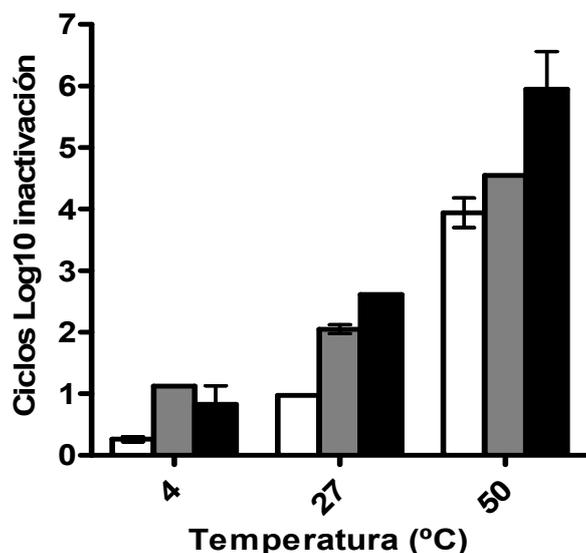
Los zumos de frutas son unos de los alimentos más adecuados para ser procesados por la tecnología de los PEAV ya que son productos cuyas propiedades sensoriales y nutritivas se ven afectadas por los tratamientos térmicos (4). Por otro lado, su bajo pH es una barrera muy eficaz para impedir la germinación la mayor parte de la flora esporulada resistente a los tratamientos de PEAV (39). Tradicionalmente, los zumos de frutas han sido considerados alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, debido a que los microorganismos patógenos no son capaces de multiplicarse a los bajos pH de los zumos de frutas. Sin embargo, en los últimos años, se han producido distintos brotes de toxiinfecciones alimentarias causados por microorganismos patógenos como *Salmonella* spp o *E. coli* O157:H7 (9). La capacidad de supervivencia de algunas cepas de microorganismos patógenos en medios de bajo pH y las bajas dosis infectivas necesarias para provocar una enfermedad en el consumidor hacen necesario el uso de medidas de control de los microorganismos patógenos, especialmente en aquellos zumos de frutas que se comercializan sin pasteurizar y refrigerados. Los PEAV podrían

ser una alternativa al procesado térmico para conseguir zumos de frutas seguros y con propiedades sensoriales y nutritivas similares a las de los zumos que se comercializan refrigerados sin pasteurizar térmicamente (20, 21, 45). Además, como el tratamiento también inactiva a la flora vegetativa alterante, este proceso contribuiría a prolongar la vida útil de estos zumos (14, 33, 50).

El pH de la mayoría de los zumos de fruta está comprendido entre 3,5 y 4,0 por lo que, según los resultados mostrados en la Figura 3.7, de los microorganismos estudiados el más resistente en medios de este pH sería la cepa de *E. coli* O157:H7. La máxima inactivación obtenida en este microorganismo a la temperatura más alta investigada en el medio de pH 3,5 fue de 3,5 ciclos logarítmicos. Este nivel de inactivación todavía se puede considerar escaso para garantizar la seguridad de los alimentos, sobre todo si la comparamos con el requerimiento establecido por la FDA (16), consistente en conseguir 5 ciclos logarítmicos de inactivación del microorganismo patógeno más resistente para la pasteurización de zumos de frutas. Con objeto de incrementar el efecto letal de los tratamientos de PEAV a distintas temperaturas, se consideró el uso de otro compuesto antimicrobiano, efectivo tanto frente a la flora Gram-positiva y como a la Gram-negativa, denominado etil lauroil arginato (LAE<sup>®</sup>). El LAE es una molécula con propiedades surfactantes con un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias, levaduras y mohos (42). Se trata de una molécula con carga positiva que se une a compuestos con carga negativa de la membrana de los microorganismos, como algunas proteínas, provocando un incremento de la permeabilidad de la membrana.

La Figura 3.8 muestra la influencia de la presencia de LAE a concentraciones de 25 y 50 ppm en la inactivación de *E. coli* O157:H7 por un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99  $\mu$ s) a diferentes temperaturas en un medio de pH 3,5. Se observa que, a 4°C, la inactivación obtenida tras el tratamiento de PEAV fue escasa incluso en presencia de

**Figura 3.8.** Influencia de la presencia de LAE en la inactivación de *E. coli* O157:H7 por PEAV (30 kV/cm, 100  $\mu$ s) a diferentes temperaturas (4, 27 y 50 °C). Medio de tratamiento: tampón McIlvaine de pH 3,5 (blanco), suplementado con 25 ppm de LAE (gris) o 50 ppm de LAE (negro).



LAE. Sin embargo, cuando el tratamiento se aplicó a 50°C se obtuvieron más de 4 ciclos logarítmicos de inactivación con una concentración de LAE de 25 ppm y más de 5 ciclos logarítmicos con una concentración de LAE de 50 ppm. Por lo tanto, con la adición de este antimicrobiano, se podrían alcanzar los niveles de inactivación establecidos por la FDA para garantizar la seguridad de los alimentos en la cepa resistente de *E. coli* O157:H7 con un tratamiento de PEAV aplicable en la práctica desde un punto de vista industrial, a una temperatura de 50°C.

### 3.6 Validación de criterios de procesado para la pasteurización de zumo de manzana por PEAV en tratamientos en flujo continuo.

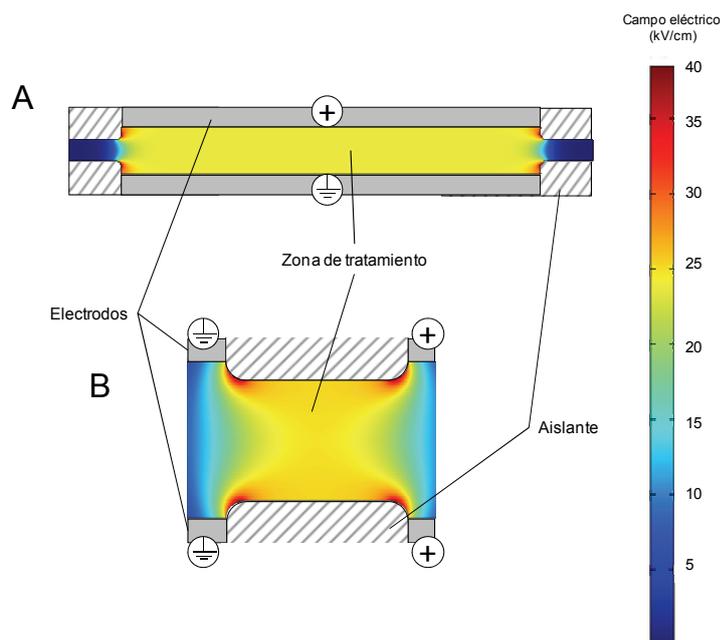
Las cámaras de tratamiento estáticas utilizadas para estudiar la resistencia microbiana a los PEAV se caracterizan porque permiten trabajar con muestras de pequeño volumen y tener un estricto control de las condiciones de procesado (49). El uso de este tipo de cámaras es recomendable cuando se quiere conocer con precisión la influencia de distintos parámetros en la resistencia microbiana a los PEAV ya que con

ellas se evitan artefactos metodológicos que pueden afectar a los resultados. Sin embargo, la aplicación industrial de los PEAV requiere la aplicación de tratamientos en flujo continuo, por lo que los resultados obtenidos en cámaras de tratamiento estáticas deben ser validados en tratamientos en flujo continuo antes de escalar la tecnología a un proceso productivo.

En los últimos años, se ha producido un importante avance en el desarrollo de cámaras de tratamiento en flujo continuo, aspecto fundamental para poder utilizar la tecnología de los PEAV para aplicaciones industriales. En el desarrollo de las cámaras de tratamiento, ha jugado un papel decisivo el empleo de técnicas de simulación numérica. La aplicación exitosa de los PEAV en la industria alimentaria exige que se puedan conocer con precisión los valores de los parámetros de procesado críticos que determinan la eficacia de la tecnología. Las pequeñas dimensiones de las cámaras de tratamiento impiden la introducción en su interior de sondas de medida que, por otro lado, afectarían al flujo del producto, a la distribución del campo eléctrico y a la temperatura. Las técnicas de simulación numérica permiten estimar la distribución espacial y temporal del campo eléctrico y la temperatura en función del flujo aplicado. Estas técnicas son muy útiles tanto para conocer los valores de los parámetros críticos de procesado que se están aplicando en el proceso en continuo como para diseñar las cámaras de tratamiento para conseguir un tratamiento lo más uniforme posible (15). Un ejemplo de la aplicación de estas técnicas de simulación numérica se muestra en la Figura 3.9, donde se compara la distribución del campo eléctrico en el interior de dos cámaras de tratamiento con dos configuraciones diferentes de los electrodos.

Desde el punto de vista del diseño de instalaciones, la cámara colineal, cuya sección al igual que la de las conducciones de la industria alimentaria, es circular, sería más adecuada que la de electrodos paralelos. Sin embargo, la distribución del campo

**Figura 3.9.** Simulación numérica de la intensidad del campo eléctrico en el interior de la zona de tratamiento de una cámara de electrodos paralelos en flujo continuo (A) y de una cámara colineal (B).



eléctrico es mucho más uniforme en la cámara de tratamiento de electrodos paralelos (23). La uniformidad del tratamiento es fundamental para garantizar que todas las partes del alimento reciben la intensidad de tratamiento necesaria para conseguir el nivel de inactivación establecido para conseguir su pasteurización (52). Atendiendo al criterio de uniformidad del tratamiento, los estudios realizados en flujo continuo se hicieron utilizando una cámara de tratamiento de electrodos paralelos.

Con objeto de evaluar la influencia de la temperatura y de la presencia de LAE en la eficacia de los PEAV en flujo continuo, se investigó el efecto letal de los tratamientos de PEAV a tres intensidades campo eléctrico (20, 25 y 30 kV/cm) modificando la temperatura de entrada (20, 30, 35 y 40°C) sobre *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana sin LAE y con una concentración de LAE de 50 ppm. Con objeto de evitar posibles efectos térmicos en el efecto letal, el número de pulsos aplicado y, por lo tanto, la energía específica total de los tratamientos, se ajustaron para que la temperatura de salida del producto no superara los 60°C.

A partir de los resultados obtenidos, se desarrollaron modelos matemáticos aplicando técnicas de regresión múltiple y se obtuvieron dos ecuaciones de segundo grado, una para el tratamiento en zumo de manzana y otra para el tratamiento en zumo de manzana a la que se le había añadido LAE (Tabla 3.3). Estas ecuaciones permiten estimar la inactivación de *E. coli* O157:H7 tras un tratamiento de PEAV en flujo continuo en función de la intensidad del campo eléctrico ( $E$ ), la temperatura inicial del producto ( $T$ ) y el tiempo de tratamiento ( $t$ ) (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Modelos matemáticos desarrollados para estimar la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana y zumo de manzana con 50 ppm de LAE a diferentes intensidades de campo eléctrico (20 - 30 kV/cm), temperaturas iniciales (20 - 40°C) y tiempos de tratamiento (hasta 124  $\mu$ s).

Medio de tratamiento	Modelo matemático
Zumo de manzana (Ec. 3.9)	$\text{Log } S = -2,41 + 0,09 \cdot E + 0,08 \cdot T + 0,19 \cdot t - 0,00027 \cdot t^2 - 0,0031 \cdot E \cdot T - 0,0068 \cdot E \cdot t - 0,0023 \cdot T \cdot t$
Zumo de manzana + 50ppm LAE (Ec. 3.10)	$\text{Log } S = -7,19 + 0,58 \cdot T + 0,25 \cdot t + 0,0059 \cdot E^2 - 0,067 \cdot T - 0,01 \cdot E \cdot T - 0,0099 \cdot E \cdot t - 0,0043 \cdot T \cdot t$

E: intensidad de campo eléctrico (kV/cm), T: temperatura (°C), t: tiempo de tratamiento ( $\mu$ s)

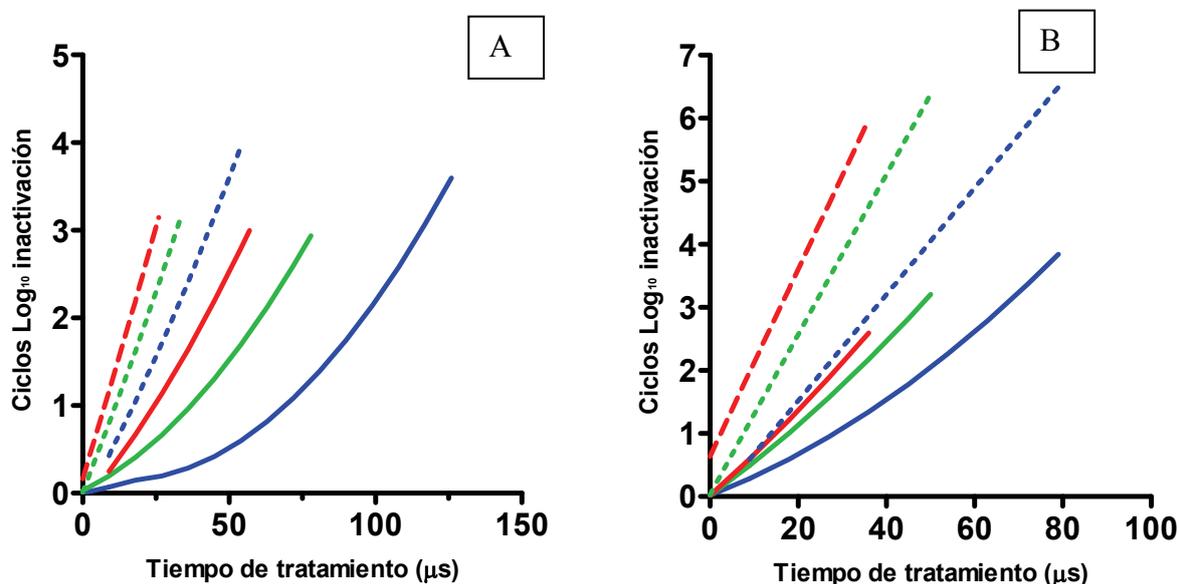
A partir de los modelos desarrollados, se obtuvieron gráficas como las que se muestran en las Figuras 3.10 A y B para ilustrar la influencia de los factores investigados en la inactivación de *E. coli* O157:H7. En la Figura 3.10A, se muestra la influencia de la intensidad del campo eléctrico y de la temperatura inicial en la inactivación de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana. Se observa que, tanto al aumentar la intensidad del campo eléctrico como la temperatura inicial de la suspensión, fue posible reducir el tiempo de tratamiento necesario para conseguir un determinado nivel de inactivación. Por ejemplo, al aumentar la temperatura de entrada del zumo de manzana en la cámara de tratamiento de 20 a 40°C, se redujo el tiempo de tratamiento para conseguir una inactivación de 3 ciclos logarítmicos de 117 a 57  $\mu$ s a una intensidad de campo eléctrico de 20 kV/cm. Por otro lado, cuando la temperatura de

entrada fue de 30°C, el incremento de la intensidad de campo eléctrico de 20 a 30 kV/cm redujo el tiempo de tratamiento desde 78 a 30  $\mu$ s. Como consecuencia de la reducción del tiempo de tratamiento, también se redujo la energía específica total necesaria para obtener la inactivación de 3 ciclos logarítmicos. Por ejemplo, para conseguir este nivel de inactivación se requería una energía específica de 145 kJ/kg cuando el tratamiento se aplicó a 20 kV/cm y una temperatura de entrada del zumo de manzana de 20°C mientras que cuando el tratamiento se aplicó a 30 kV/cm y una temperatura inicial de 40°C sólo se requería una energía específica de 63 kJ/kg.

La Figura 3.10B muestra un ejemplo de la influencia de la presencia de LAE (50 ppm) en la inactivación de *E. coli* O157:H7 por un tratamiento de PEAV de 25 kV/cm a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento. La presencia de LAE también disminuyó el tiempo de tratamiento y, como consecuencia, la energía específica necesaria para obtener un determinado nivel de inactivación. Sin embargo, es incluso más destacable que, mientras que en ausencia de LAE la máxima inactivación obtenida era de entre 3 y 4 ciclos logarítmicos, en presencia de este agente antimicrobiano se obtuvieron niveles de inactivación superiores a los 6 ciclos logarítmicos aplicando los mismos tratamientos de PEAV.

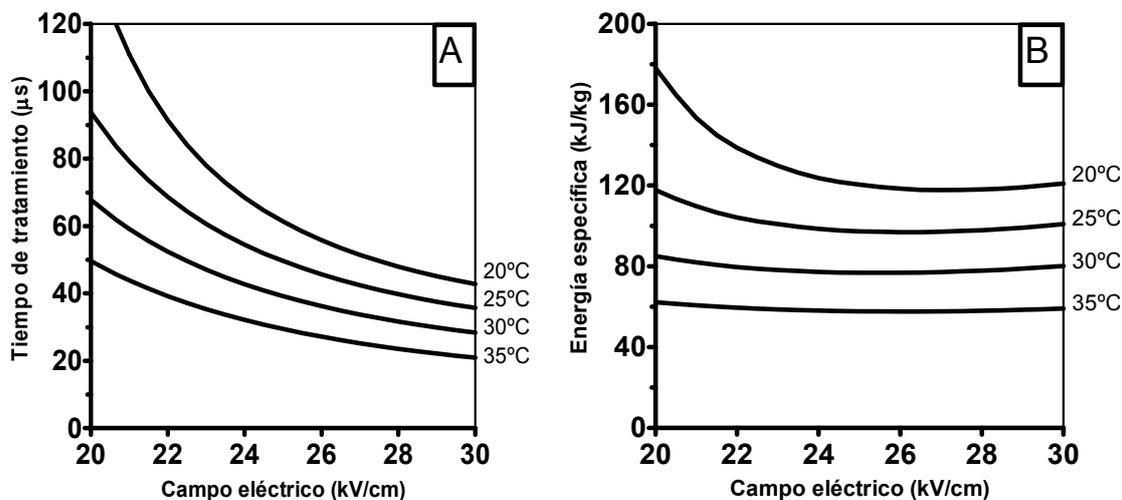
En las Figuras 3.11 A y B se muestran respectivamente el tiempo de tratamiento y la energía específica necesarios para obtener la reducción de 5 ciclos logarítmicos recomendada por la FDA (16) en la población de *E. coli* O157:H7 suspendida en zumo de manzana con 50 ppm de LAE obtenidos a partir de la ecuación 3.10. En ellas se observa que el incremento de la intensidad del campo eléctrico o de la temperatura de entrada del zumo en la cámara de tratamiento redujo notablemente el tiempo de tratamiento necesario para obtener los 5 ciclos logarítmicos de inactivación. Sin embargo, independientemente de la temperatura inicial, el incremento de la intensidad

**Figura 3.10.** (A) Influencia del campo eléctrico y la temperatura inicial en la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana estimada por la ecuación 3.9. Condiciones de tratamiento: intensidad de campo eléctrico de 20 kV/cm (líneas continuas) y 30 kV/cm (líneas discontinuas); temperaturas iniciales de 20°C (azul), 30°C (verde) y 40°C (rojo). (B) Influencia de la presencia de LAE (50 ppm) en la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana estimada por las ecuaciones 3.9 y 3.10, a diferentes temperaturas iniciales. Condiciones de tratamiento: intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm; medio de tratamiento: zumo de manzana (líneas continuas) y zumo de manzana suplementado con 50 ppm de LAE (líneas discontinuas); temperaturas iniciales de 20°C (azul), 30°C (verde) y 35°C (rojo).



de campo eléctrico en el rango de 20 a 25 kV/cm fue más efectivo en la reducción del tiempo de tratamiento que a intensidades de campo eléctrico superiores a 25 kV/cm (Figura 3.11A). Por otro lado, se observa que la temperatura inicial también tuvo una influencia significativa en la energía específica necesaria para conseguir los 5 ciclos logarítmicos de inactivación (Figura 3.11B). Mientras que a bajas temperaturas de entrada, el consumo energético del proceso se vio sustancialmente reducido al aumentar la intensidad del campo eléctrico hasta aproximadamente 25 kV/cm, a temperaturas superiores a los 30°C la intensidad del campo eléctrico no afectó a la energía específica requerida en el rango de 20 a 30 kV/cm. La menor energía específica requerida para alcanzar los 5 ciclos logarítmicos de inactivación en la población de *E. coli* O157:H7 fue de 60 kJ/kg, con una temperatura de entrada del zumo en la cámara de tratamiento de 35°C. Esta inactivación, con este consumo energético, se puede conseguir aplicando un tiempo de tratamiento de alrededor de 50 μs si el tratamiento se aplica al menor

**Figura 3.11.** Estimación del tiempo de tratamiento (A) y energía específica (B) requeridos para alcanzar 5 ciclos logarítmicos de inactivación en una suspensión de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana suplementado con 50 ppm de LAE a distintas intensidades de campo eléctrico y temperaturas iniciales. Los datos fueron estimados a partir de la ecuación 3.10.



campo eléctrico investigado, 20 kV/cm o de 20  $\mu$ s si el tratamiento se aplica a 30 kV/cm. Por lo tanto, este tipo de representaciones pueden resultar muy útiles para definir criterios de procesado para conseguir una inactivación equivalente. El uso de uno u otro criterio en la práctica industrial dependerá de las características del equipo disponible y de los costes energéticos del proceso.

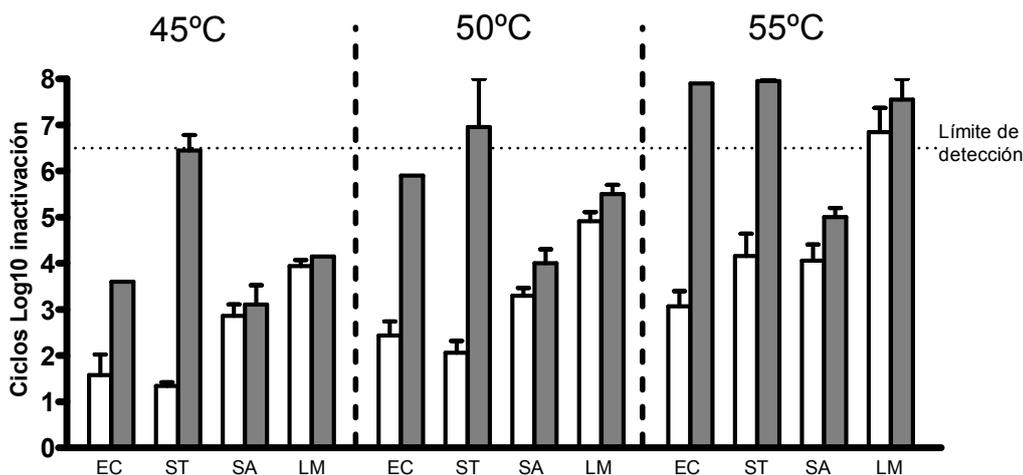
Los primeros estudios en flujo continuo se realizaron con la cepa de *E. coli* O157:H7 ya que había sido demostrado en estudios previos con la cámara de tratamiento estática, que esta cepa era la más resistente a los tratamientos de PEAV aplicados a distintas temperaturas (Figura 3.7). Una vez demostrado que era posible conseguir al menos 5 ciclos logarítmicos de inactivación en este microorganismo aplicando tratamientos en flujo continuo (Figura 3.10B), se decidió evaluar si estos tratamientos eran también eficaces para conseguir niveles de inactivación de la misma magnitud en las otras tres cepas de microorganismos patógenos resistentes a los PEAV utilizadas en esta investigación.

De acuerdo con las relaciones entre la intensidad del campo eléctrico, la temperatura inicial y el tiempo de tratamiento o la energía necesaria para conseguir 5 ciclos de

inactivación en la población de *E. coli* O157:H7, que se muestra en la Figura 3.11, las condiciones de tratamiento seleccionadas para evaluar la inactivación en las cepas de *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459 y *Salmonella* Typhimurium 878 fueron una intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm y una temperatura inicial de tratamiento de 35°C. Con estas condiciones, se conseguía la inactivación establecida, en *E. coli* O157:H7, con el mínimo consumo energético (60 kJ/kg) y aplicando un corto tiempo de tratamiento (30  $\mu$ s), que se corresponden con 10 pulsos de 3  $\mu$ s.

En la Figura 3.12, se muestran los ciclos logarítmicos de inactivación conseguidos al aplicar el tratamiento seleccionado (25 kV/cm, temperatura inicial de 35°C) a tres tiempos de tratamiento diferentes, que se correspondían con temperaturas de salida de 45, 50 y 55°C, en las otras tres cepas suspendidas en zumo de manzana y zumo de manzana suplementado con 50 ppm de LAE. A efectos comparativos, en la Figura 3.12, se han incluido los resultados obtenidos para la cepa de *E. coli* O157:H7. Cuando los tratamientos se aplicaron en el zumo de manzana, sólo se consiguió una inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en la cepa de *L. monocytogenes* 5672 cuando la temperatura de salida fue de 55°C. Aunque *L. monocytogenes* 5672 fue identificada como la cepa más resistente a los tratamientos de PEAV a temperaturas alrededor de 25°C en tampón de pH similar al pH del zumo de manzana (Figura 3.3), fue la más sensible al tratamiento de PEAV en continuo. Este comportamiento se puede atribuir a que el incremento de la temperatura de tratamiento tiene un efecto sensibilizante frente a los PEAV, mayor en la cepa de *L. monocytogenes* 5672 que en las otras tres cepas investigadas. Cuando se añadió LAE al zumo de manzana, se obtuvo una inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en la cepa de *Salmonella* Typhimurium 878 a una temperatura de salida de 45°C y en todas las cepas investigadas, excepto en la cepa de *S. aureus* 4459, a una temperatura de salida de 50°C. Cuando la temperatura de salida fue

de 55°C, fue posible lograr una inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en las 4 cepas resistentes a los PEAV. Para conseguir una inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos en el zumo de manzana sin añadir LAE, fue necesario incrementar la temperatura de tratamiento hasta 60°C en las cepas de *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459 y *Salmonella* Typhimurium y hasta 65°C en la cepa de *E. coli* O157:H7.



**Figura 3.12.** Inactivación de *E. coli* O157:H7 (EC), *Salmonella* Typhimurium 878 (ST), *S. aureus* 4459 (SA) y *L. monocytogenes* 5672 (LM) suspendidos en zumo de manzana (barras blancas) y zumo de manzana con 50 ppm de LAE (barras grises) tras aplicar tratamientos de PEAV (25 kV/cm) a una temperatura inicial de 35°C y diferentes temperaturas finales (45, 50 y 55°C).

Por lo tanto, *los resultados obtenidos en esta investigación han demostrado que la combinación de un tratamiento de PEAV con temperaturas moderadas es una estrategia adecuada que permite definir los criterios de procesado para conseguir reducir la población de 4 cepas de microorganismos patógenos, especialmente resistentes a los PEAV, al menos 5 ciclos logarítmicos.* La consecución de este nivel de inactivación requiere incrementar la temperatura de salida del producto hasta los 65°C. Aunque esta temperatura está próxima a las que se utilizan en algunos tratamientos térmicos, el tiempo de residencia (0,8 segundos) es mucho menor que el utilizado cuando se procesan alimentos a estas temperaturas. Aunque es un aspecto a investigar, es esperable que este corto tiempo de tratamiento no afecte a las propiedades sensoriales

y nutritivas del producto. La instalación de un sistema de reaprovechamiento de energía para precalentar el producto sin tratar, con el que sale tras el tratamiento, podría permitir compensar el incremento del consumo energético del proceso debido a la necesidad de introducir el producto a temperaturas superiores a la temperatura ambiente (35°C) (20, 48). La adición del agente antimicrobiano LAE, efectivo tanto en microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos, permite conseguir niveles de inactivación superiores a los 5 ciclos logarítmicos con una temperatura de salida menor (55°C) y, en consecuencia, con tratamientos de PEAV más cortos y de un menor consumo energético.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

1. **Álvarez I, Raso J, Palop A, Sala FJ**, 2000. Influence of factors on the inactivation of *Salmonella Senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 143-146.
2. **Álvarez I, Condón S, Raso J**, 2006. Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 97-129). Springer: Nueva York.
3. **Álvarez I, Heinz V**, 2007. Hurdle technology and the preservation of food by Pulsed Electric Fields. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food Preservation by Pulsed Electric Fields. From Research to Application* (pp. 165-175). Woodhead Publishing: Cambridge.
4. **Alwazeer D, Cachon R, Divies C**, 2002. Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice, *J. Food Protec.* 65, 1586–1589.

5. **Amiali M, Ngadi MO, Smith JP, Raghavan GSV**, 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *J. Food Eng.*79, 689–694.
6. **Aronsson K, Rönner U**, 2001. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.*2, 105-112.
7. **Baranyi J, Pin C, Ross T**, 1999. Validating and comparing predictive models. *Int. J. Food Microbiol.*48, 159-166.
8. **Boziaris IS, Humpheson L, Adams MR**, 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT4. *Int. J. Food Microbiol.*43, 7-13.
9. **Bull MK, Szabo EA, Cole MB, Stewart CM**, 2005. Toward validation of process criteria for high-pressure processing of orange juice with predictive models. *J. Food Protec.* 68, 949-54.
10. **Cebrián, G**, 2009. *Mecanismos de inactivación y resistencia de Staphylococcus aureus a diferentes procesos de conservación de los alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
11. **da Cruz AG, Fonseca-Faria JDA, Isay-Saad SM, André-Bolini HM, SantAna AS, Cristianini M**, 2010. High pressure processing and pulsed electric fields: Potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 483-493.
12. **Delves-Broughton J**, 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44, 100–112.
13. **Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J**, 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, 14, 273–285.

14. **Dunn JE**, 2001. Pulsed electric field processing: an overview. En GV Barbosa-Cánovas, QH Zhang (Eds.), *Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 1-30). Technomic Publishing: Lancaster.
15. **Fiala A, Wouters PC, van den Bosch E, Creyghton YLM**, 2001. Coupled electrical-fluid model of pulsed electric field treatment in a model food system. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.*2, 229-238.
16. **Food and Drug Administration (FDA)**, 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP) procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. *Federal Register*, 66, FR 6137-6202.
17. **Gallo LI, Pilosof AMR, Jagus RJ**, 2007. Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *J. Food Eng.*79, 188-193.
18. **García D, Gómez N, Mañas P, Condón S, Raso J, Pagán R**, 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Microbiol.* 99, 94-104.
19. **García D, Gómez N, Raso J, Pagán R**, 2005. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* .6, 388–395.
20. **Heinz V, Toepfl S, Knorr D**, 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.*.4, 167-175.
21. **Indrawati I, Plancken I, Van Loey A, Hendrickx M**, 2008. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends Food Sci. Technol.* 19 (6), 300-308.

22. **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)**, 2002. *Microorganismos de los Alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
23. **Jaeger H, Meneses N, Knorr D**, 2009. Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution, flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 470-480.
24. **Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A**, 1992. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1412-1420.
25. **Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A**, 1993. The effect of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 117-122.
26. **Krogfelt KA, Hjulgaard M, Sorensen K, Cohen PS, Givskow M**, 2000. rpoS gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* BJ4 during competitive colonization of the mouse large intestine. *Infection and Immunity* 68, 2518–2524.
27. **Lado BH, Yousef AE**, 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2223-2229.
28. **Liang ZW, Mittal GS, Griffiths MW**, 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *J. Food Protec.* 65, 1081-1087.
29. **Mafart P, Couvert O, Gaillard S, Leguerinel I**, 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107-113.

30. **McMeekin TA, Ross T**, 2002. Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. *Int. J. Food Microbiol.*, 78, 133–153.
31. **McNamee C, Noci F, Cronin Da, Lyng JG, Morgan DJ, Scannell AGM**, 2010. PEF based hurdle strategy to control *Pichia fermentans*, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* k12 in orange juice. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 13-18.
32. **Metrick C, Hoover D G, Farkas DF**, 1989. Effect of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *J. Food Sci.*, 54, 1547-1564.
33. **Min S, Jin ZT, Min SK, Yeom H, Zhang QH**, 2003. Commercial-Scale Pulsed Electric Field Processing of Orange Juice. *J. Food Sci.* 68 (4), 1265-1271.
34. **Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O**, 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 328-340.
35. **National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)** 2006. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *J. Food Protec.*, 69, 1190-1216.
36. **Ng TM, Schaffner DW**, 1997. Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4) 1237–1243.
37. **Pagán R, Esplugas S, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1998. Inactivación of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Sci. Technol. Int.* 4, 33-44.
38. **Puértolas E, López N, Condón S, Álvarez I, Raso J**, 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 49-55.

39. **Ramaswamy HS, Abbatemarco C**, 1996. Thermal processing of fruits. Em LP Somogyi, HS Ramaswamy, YH Hui (Eds.), *Processing fruits: Science and Technology (I)* (pp. 25-65). Technomic Publishing Co: Lancaster Basel.
40. **Raso J, Barbosa-Cánovas GV**, 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit. Rev. Food Sci.*43, 265-285.
41. **Rodrigo D, Ruiz P, Barbosa-Cánovas GV, Martínez A, Rodrigo M**, 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.*81, 223-229.
42. **Rodríguez E, Seguer J, Rocabayera X, Manresa A**, 2004. Cellular effects of monohydrochloride of l-arginine, N<sup>α</sup>-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 903–912.
43. **Saulis G**, 2010. Electroporation of Cell Membranes: The Fundamental Effects of Pulsed Electric Fields in Food Processing. *Food Eng. Rev.* 2, 52-73.
44. **Sepúlveda DR, Góngora-Nieto MM, San-Martín MF, Barbosa-Cánovas GV**, 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT-Food Sci. Technol.* 38, 167-172.
45. **Soliva-Fortuny R, Balasa A, Knorr D, Martín-Belloso O**, 2009. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20 (11-12), 544-556.
46. **Somolinos M, García D, Condón S, Mañas P, Pagán R**, 2007. Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3814-3821.
47. **Terebiznik M, Jagus R, Cerrutti P, de Huergo MS, Pilosof AMR**, 2002. Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *J. Food Protec.* 65, 1253-1258.

48. **Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D**, 2006. Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing, *Food Rev. Int.*, **22**, 405–423.
49. **Van den Bosch HFM**, 2007. Chamber design and process conditions for pulsed electric field treatment of food. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), Food preservation by pulsed electric fields (pp. 70-93). Woodhead Publishing: Cambridge.
50. **Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Lyng JG, Morgan DJ**, 2010. Shelf Life And Sensory Attributes Of A Fruit Smoothie-Type Beverage Processed With Moderate Heat And Pulsed Electric Fields. *LWT* 43 (7), 1067-1073.
51. **Weibull W**, 1951. A Statistical Distribution Function of Wide Applicability. *J. Appl. Mech.-Trans. ASME* 18, 293-297.
52. **Wouters PC, Álvarez I, Raso J**, 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 112-121.
53. **Wouters PC, Bos AP, Ueckert J**, 2001. Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3092-3101.