

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO  
NATURAL (ETSIAMN)



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

## **Aplicación de campos eléctricos moderados para la inactivación de esporas de *Aspergillus niger* en una emulsión**

Curso Académico: 2020-2021

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Alumno/a:** María Ana Lozano Aroca

**Tutores Académicos:** José Javier Benedito Fort

José Vicente García Pérez

**Tutora Experimental:** Ángela Gómez Gómez



Valencia, julio 2021

**Título:** Aplicación de campos eléctricos moderados para la inactivación de esporas de *Aspergillus niger* en una emulsión.

**Resumen:** El proceso de inactivación microbiana es de gran interés en la industria alimentaria, debido a la necesidad de garantizar la calidad y seguridad en los productos consumidos por la población. En la actualidad, el procesado de alimentos líquidos para la inactivación de microorganismos a escala industrial suele realizarse en mayor medida a través de tratamientos térmicos que alcanzan temperaturas (T) elevadas, mayores a 100°C. Sin embargo, estas temperaturas producen pérdidas de sabor y nutrientes que son esenciales en el producto final. Además, los tratamientos térmicos convencionales suponen un tiempo (t) de procesado y un coste energético elevados. Por este motivo, la inactivación microbiana constituye un amplio campo de investigación, donde se buscan nuevas tecnologías de inactivación no térmicas, que sean más eficientes. En este sentido, algunos ejemplos de ello son los ultrasonidos, el procesado a altas presiones hidrostáticas, los campos eléctricos pulsados (del inglés PEF) o los campos eléctricos moderados (del inglés MEF).

La tecnología MEF empleada en el presente estudio, consiste en la aplicación de campos eléctricos inferiores a 1 kV/cm a temperaturas relativamente moderadas (normalmente inferiores a 100°C). A pesar de la relevancia en la aplicación de estas tecnologías de inactivación microbiana en la industria alimentaria, no se descarta su uso para otros fines, como por ejemplo para sueros o fluidos fisiológicos de industrias farmacéuticas. Así pues, el objetivo del presente trabajo fue el estudio de la inactivación de esporas de *A.niger* en una emulsión haciendo uso de la tecnología MEF. Para ello, se aplicaron perfiles de temperatura-tiempo a diferentes voltajes y frecuencias. Los resultados mostraron mayor eficacia ( $p < 0,05$ ) en la inactivación de esporas de *A.niger* en una emulsión con la tecnología MEF comparado con el tratamiento térmico convencional. Esta efectividad se consiguió con las siguientes condiciones: una T de 60°C, campos eléctricos de 37,5, 34,38 y 31,25 V/cm, frecuencias de 60 y 1200 Hz y tiempos de 5-10 min. Particularmente, a 37,5 V/cm (y ambas frecuencias) a tiempos de 5 min se alcanzó la inactivación completa (>6 ciclos logarítmicos) de las esporas de *A.niger*. No obstante, es de interés resaltar que los efectos del voltaje y la frecuencia no han resultado significativos ( $p > 0,05$ ) en los rangos estudiados en el presente trabajo. Adicionalmente, sería necesario estudiar el efecto del tratamiento sobre la calidad de la emulsión tratada.

**Palabras clave:** campos eléctricos moderados, *Aspergillus niger*, tratamiento térmico, inactivación microbiana, tecnologías no térmicas, seguridad alimentaria.

Alumno/a: María Ana Lozano Aroca

Tutores Académicos: José Vicente García Pérez

José Javier Benedito Fort

Tutora Experimental: Ángela Gómez Gómez

Valencia, julio 2021

**Title:** Microbial inactivation of *Aspergillus niger* spores by using moderate electric fields in an emulsion.

**Abstract:** Microbial inactivation is of great interest in the food industry, due to the need to guarantee the quality and safety of the products consumed by the population. Nowadays, liquid foods processing for inactivation of microorganisms on an industrial scale is mainly carried out by thermal treatments that reach high temperatures (T), greater than 100°C. However, these temperatures cause loss of flavors and nutrients, which are essential in the final product. In addition, conventional thermal treatments involve high processing time (t) and energy costs. For this reason, microbial inactivation is of great interest for investigation in the food industry. In this way, new non thermal inactivation technologies, which are more efficient, are being studied. Some examples of them are ultrasounds, high hydrostatic pressures, pulsed electric fields (PEF) or moderate electric fields (MEF).

The MEF technology used in this study is based on the application of electric fields lower than 1 kV/cm at relatively moderate temperatures (usually lower than 100°C). Despite the relevance of the application of these microbial inactivation technologies in the food industry, other uses are not discarded, such as for microbial inactivation in serum or physiological fluids for pharmaceutical industries. Thus, the objective of the present work was the study of the inactivation of *A.niger* spores in an emulsion with MEF technology. For this purpose, temperature-time profiles at different voltages and frequencies were applied. Results showed greater efficacy ( $p<0,05$ ) on inactivation of *A.niger* spores in an emulsion in MEF technology compared to conventional heat treatment. This effectiveness has been achieved with the following conditions in MEF: a T of 60°C, electric field strengths of 37,5, 34,38 and 31,25 V/cm, frequencies of 60 and 1200 Hz and times between 5-15 min. Particularly, at 37,5 V/cm (and both frequencies), at times of 5 min, total inactivation (>6 logarithmic cycles) of *A.niger* spores in an emulsion was reached. However, it is necessary to highlight that the effects of voltage and frequency have not been significant ( $p>0,05$ ) in the ranges considered in the present study. Additionally, it would be necessary to study the effect of the treatment on the quality of the treated emulsion.

**Key words:** moderate electric fields, *Aspergillus niger*, thermal treatment, microbial inactivation, non-thermal technologies, food safety.

Student: María Ana Lozano Aroca

Academic tutors: José Vicente García Pérez

José Javier Benedito Fort

Experimental tutor: Ángela Gómez Gómez

Valencia, July 2021

# Índice

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Inactivación microbiana .....	2
1.1.1. Daño subletal, adaptación a estreses y resistencia microbiana .....	4
1.2. Métodos convencionales de inactivación microbiana.....	5
1.3. Tecnologías emergentes de inactivación microbiana.....	7
1.3.1. Ventajas del uso de tecnologías emergentes.....	11
1.4. Hongos como diana de inactivación microbiana .....	12
<b>2. OBJETIVO Y PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1. Preparación de material.....	14
3.1.1. Medio de emulsión.....	14
3.1.2. Preparación de la suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i> .....	15
3.2. Tratamientos térmicos .....	15
3.2.1. Diluciones seriadas, siembras y recuentos .....	15
3.3. Equipo MEF.....	16
3.3.1. Curvas temperatura (T) vs tiempo (t) .....	17
3.3.2. Ensayos MEF con medio Intralipid 20% inoculado .....	18
3.4. Inactivación de <i>A.niger</i> .....	18
3.5. Análisis estadístico .....	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
4.1. Curvas temperatura (T) vs tiempo (t).....	19
4.2. Efecto de la aplicación de campos eléctricos moderados sobre la inactivación de <i>A.niger</i> .....	21
4.3. Efecto del voltaje en la inactivación de <i>A.niger</i> .....	25
4.4. Efecto de la frecuencia en la inactivación de <i>A.niger</i> .....	27
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>28</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>29</b>
ANEXOS.....	36

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Valores de tiempo (min) para alcanzar la T establecida en las condiciones ensayadas en el equipo MEF para el agua y la emulsión.....	20
--	----

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Diagrama representativo de las diferentes etapas en la electroporación.....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura del hongo <i>A. niger</i> . Forma de las colonias sembradas en medio sólido.....	12
<b>Figura 3.</b> Planificación experimental del trabajo realizado.....	14
<b>Figura 4.</b> Esquema de diluciones seriadas y siembras en tratamientos térmicos.....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema del equipo MEF empleado.....	17
<b>Figura 6.</b> Perfiles de T vs t en agua para 10 condiciones ensayadas mediante el equipo MEF.....	20
<b>Figura 7.</b> Perfiles de T vs t en la emulsión Intralipid 20% en 10 condiciones ensayadas mediante el equipo MEF.....	21
<b>Figura 8.</b> Comparación de tratamiento térmico a 50°C y ensayo de MEF a 50°C.....	21
<b>Figura 9.</b> Comparación de tratamiento térmico a 55°C y ensayos de MEF a 55°C.....	22
<b>Figura 10.</b> Gráficos de intervalos LSD (95%) para los factores tiempo y tipo de tratamiento a 55°C.....	22
<b>Figura 11.</b> Comparación de tratamiento térmico a 60°C y ensayos de MEF a 60°C.....	23
<b>Figura 12.</b> Gráficos de intervalos LSD (95%) para los factores tipo de tratamiento y tiempo a 60°C.....	23
<b>Figura 13.</b> Comparación de tratamiento térmico a 65°C y ensayos de MEF donde se emplea una temperatura de 65°C.....	24
<b>Figura 14.</b> Gráficos de intervalos LSD (95%) para los factores tipo de tratamiento y tiempo a 65°C.....	24
<b>Figura 15.</b> Evaluación del efecto del voltaje en ensayos de MEF mediante intervalos LSD (95%). Comparación de ensayos a una T = 60°C y frecuencia = 1200 Hz con voltajes de 300 V, 275 V y 250 V. Comparación de ensayos a una T = 60°C y frecuencia = 60 Hz con voltajes de 300 V y 250 V.....	25
<b>Figura 16.</b> Evaluación del efecto de la frecuencia en ensayos de MEF mediante intervalos LSD (95%). Comparación de ensayos a una T = 60°C y voltaje = 300 V con frecuencias de 60 Hz y 1200 Hz. Comparación de ensayos a una T = 60°C y voltaje = 250 V con frecuencias de 60 Hz y 1200 Hz.....	27

## Abreviaturas

---

Actividad del agua ( $a_w$ )

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)

Alternating Current (AC), Corriente alterna

Analysis of Variance (ANOVA), Análisis de la varianza

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Centro de control y prevención de enfermedades

CFU/mL: Colony forming unit per millilitre, Unidad formadora de colonias por mililitro

Conductividad ( $\sigma$ ): mS/cm

Cold Plasma (CP), Plasma frío

DNA: Deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

E: campo eléctrico externo

Enfermedad transmitida por alimentos (ETA)

Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Centro europeo de control y prevención de enfermedades

European Food Safety Authority (EFSA), Autoridad europea de seguridad alimentaria

Factor sigma ( $\sigma^s$ )

Factor sigma alternativo (sigB)

Food and Drug Administration (FDA), Administración de alimentos y medicamentos

Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST)

High Hydrostatic Pressures (HHP), Altas presiones hidrostáticas

High Power Ultrasound (HPU), Ultrasonidos de alta potencia

High Temperature Short Time (HTST), Alta temperatura y corto tiempo

Least Significance Difference (LSD), Intervalos LSD

Membrane Filtration (MF), Filtración a través de membranas

Scanning Electron Microscope (SEM), Microscopía electrónica de barrido

Microwave (MW), Microondas

Moderate Electric Fields (MEF), Campos eléctricos moderados

Nisina (NS)

Ohmic heating (OH), Calentamiento óhmico

Pulsed Electric Fields (PEF), Campos eléctricos pulsados

Radiofrecuencias (RF)

Radiación Ultravioleta (radiación UV)

Supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>), CO<sub>2</sub> supercrítico

Shear stress (SS), Esfuerzo cortante rotacional

Ultra-High Temperature (UHT), Temperaturas ultra altas

U.S. Department of Agriculture (USDA), Departamento de Agricultura de EEUU

Valor  $D$  o  $D_T$ : tiempo necesario a una temperatura dada, para reducir la población microbiana en 1 ciclo  $\log_{10}$

Valor  $z$ : incremento de temperatura para reducir el valor  $D_T$  en un ciclo  $\log_{10}$

Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

$V'_m$ : diferencia de potencial de reposo

$V$ : diferencia de potencial

$V_c$ : valor límite o umbral de campo eléctrico

World Health Organization (WHO), Organización Mundial de la Salud



# 1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población en los últimos años ha incrementado el consumo de alimentos. Por ello, las industrias alimentarias deben garantizar a los consumidores productos inocuos y seguros, y así, poder evitar la transmisión de enfermedades a través de ellos. La OMS estima que existen más de 200 enfermedades diferentes que se producen por el consumo de alimentos contaminados por bacterias, virus, hongos, parásitos, toxinas o sustancias químicas tales como los metales pesados. La contaminación de alimentos puede darse en cualquier etapa de la cadena de producción, de almacenamiento, de entrega o incluso durante el proceso de preparación para el consumo del alimento (WHO, 2021) . Adicionalmente, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) suponen un grave problema de salud pública a nivel mundial, afectando también al turismo o a la economía de los países (Hoffmann y Scallan, 2017).

En el año 2010, según datos de la OMS, 600 millones de personas presentaron enfermedades transmitidas por la ingesta de alimentos en mal estado y de ellas unas 420.000 murieron. Asimismo, los individuos que con mayor frecuencia se encuentran más afectados por las ETA son: la población de personas mayores, los niños jóvenes, las personas con el sistema inmunológico debilitado (pacientes con diabetes, infectados por VIH, personas en tratamiento con quimioterapia o radioterapia, etc.) y las embarazadas (CDC, 2020). Por otro lado, este tipo de enfermedades presentan una mayor incidencia en países poco desarrollados en comparación a los más desarrollados (Hoffmann y Scallan, 2017; Odeyemi, 2016) .

Entre los problemas que se pueden llegar a producir debido al consumo de alimentos en mal estado se incluyen: daños en el aparato gastrointestinal (produciéndose con frecuencia diarreas), fallos a nivel renal y hepático, problemas neurológicos, artritis, deficiencias del sistema inmunitario o la predisposición a sufrir diferentes tipos de cáncer, entre otros muchos efectos (WHO, 2021). Es preciso remarcar que los efectos que pueden manifestarse en los individuos varían según la especie de microorganismo patógeno que haya colonizado. De forma adicional, los problemas presentados por la ingesta de alimentos en mal estado son con mayor frecuencia signos y síntomas menores, aunque en ciertas ocasiones pueden acabar en la muerte del individuo (FDA, 2021).

Existen evidencias de que el cambio climático afecta tanto a la incidencia como a la prevalencia de las enfermedades transmitidas a través de los alimentos contaminados (Gregory et al., 2005; Park et al., 2018). Por ello, las condiciones climáticas pueden influir en el crecimiento de los patógenos, la supervivencia y las vías de transmisión de los mismos. Se sabe que, en muchas ocasiones, un aumento de temperatura se traduce en un incremento del ciclo de replicación de muchos microorganismos patógenos, por tanto, estos pueden colonizar rápidamente los alimentos. Incluso, el 32% de los brotes de enfermedades investigados en Europa por el consumo de alimentos en mal estado, se debe en mayor medida al factor de la temperatura (ECDC, 2009). La temperatura o la humedad relativa son los factores climáticos más estudiados y están relacionados

significativamente con enfermedades transmitidas por alimentos en mal estado, como la salmonelosis o las infecciones por *Escherichia coli* patogénica (Kim et al., 2015).

Adicionalmente, también es de interés el estudio de otros factores climáticos y su vinculación con el aumento de enfermedades transmitidas a través de alimentos contaminados. Así, conociendo cómo estos factores afectan a los diferentes patógenos que se encuentran en alimentos, pueden diseñarse estrategias de prevención de este tipo de enfermedades (Kim et al., 2015; Park et al., 2018).

Para limitar los peligros de la contaminación de alimentos, organizaciones como la OMS o el CDC proponen pautas a la población de cómo actuar para evitar las ETA. Además, existen entidades reguladoras como la EFSA, que obligan a los países a realizar controles de los alimentos para evitar la transmisión de enfermedades. Con este propósito, algunas técnicas utilizadas para la detección de microorganismos patógenos o sus toxinas en los alimentos son: técnicas de detección del material genético, aproximaciones inmunológicas como el ensayo *ELISA* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), técnicas de bioluminiscencia, espectroscopía o la detección por cultivo del microorganismo (Sharif et al., 2018).

La responsabilidad en la seguridad alimentaria recae primeramente en la producción a nivel industrial, de ahí, el interés por los métodos de inactivación microbiana. Sin embargo, la prevención de ETA también depende de entidades reguladoras, como la *European Food Safety Authority* (EFSA) o la *Food and Drug Administration* (FDA), los gobiernos y las buenas prácticas alimentarias de los consumidores (Sharif et al., 2018).

### **1.1. Inactivación microbiana**

Los procesos de inactivación microbiana son de especial interés en el campo de la producción a gran escala de alimentos. Se han desarrollado numerosos métodos convencionales para la conservación de alimentos. Entre ellos pueden encontrarse aquellos que utilizan el calor (como la pasteurización y esterilización), la refrigeración y congelación, los basados en la reducción de la actividad del agua ( $a_w$ ) (mediante la adición de sales, azúcares, etc. o el secado) o los basados en la adición de preservantes alimentarios. De entre estos, los tratamientos térmicos son los que permiten la inactivación de microorganismos, patógenos o alterantes, frente al efecto inhibitorio del crecimiento del resto de tecnologías. Aunque estos métodos convencionales de conservación, diferentes a los tratamientos térmicos, son eficaces contra microorganismos patógenos, si son correctamente diseñados y aplicados, existen microorganismos capaces de sobrevivir a los mismos. Por otra parte, los tratamientos por calor presentan el inconveniente de afectar a las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos. Por ello, en la industria alimentaria están surgiendo nuevos métodos no convencionales para poder mejorar la seguridad y calidad alimentaria (Roohinejad et al., 2018).

Por otro lado, la inactivación microbiana presenta también una gran importancia en la industria farmacéutica, ya que muchas de las soluciones y medicamentos (tanto de administración oral como intramuscular o intravenosa) que se emplean pueden contaminarse durante el proceso de fabricación. Esta contaminación puede provenir de

las materias primas, los equipos, el ambiente o los operarios encargados del proceso, entre otras causas. Es por ello que estas nuevas tecnologías de inactivación microbiana pueden tener aplicación para obtener productos farmacológicos más seguros (Delgado et al., 2004).

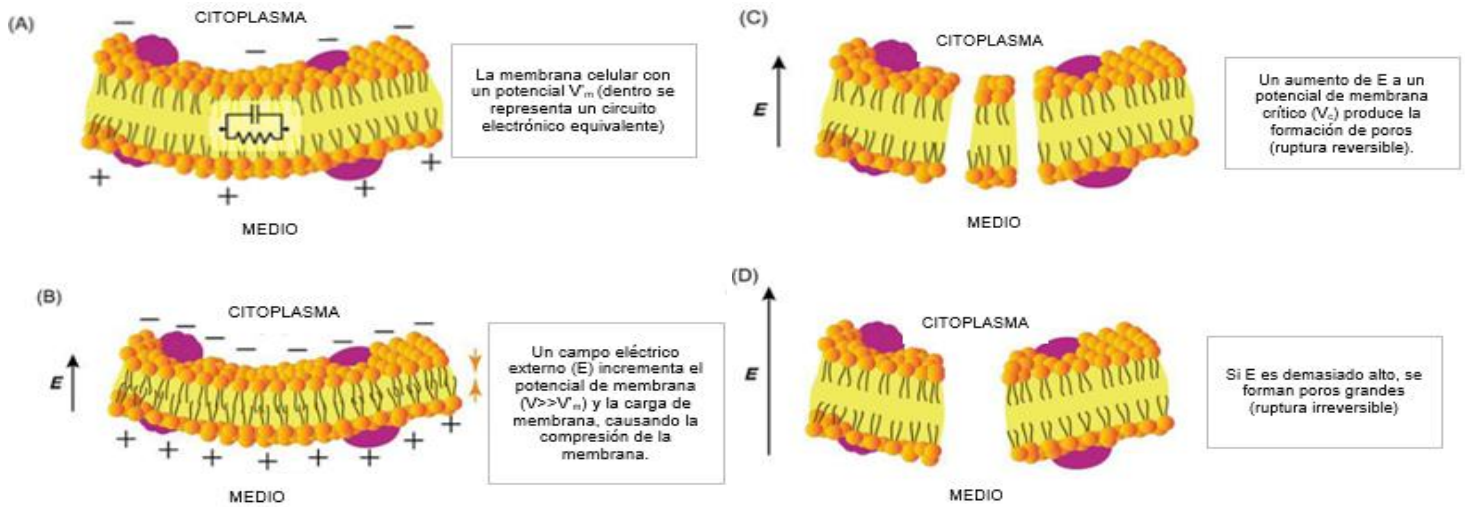
### Mecanismos de inactivación celular

Se considera a una célula viva a aquella capaz de replicarse indefinidamente en las condiciones adecuadas. Para poder determinar la viabilidad celular en este caso, se hace uso de la capacidad de las células para crecer en un medio sólido o líquido. Por otro lado, para lograr la conservación de alimentos, se considera que una célula microbiana está inactivada si ésta pierde su potencial replicativo. Se sabe a través de la literatura científica que para que se produzca la inactivación de las células microbianas deben alterarse una o más estructuras o funciones celulares (Cebrián et al., 2017). Entre los daños estructurales se encuentran: la ruptura de las membranas, cambios conformacionales del DNA, alteraciones en ribosomas o la agregación de proteínas. Por otro lado, entre los daños a las funciones fisiológicas celulares se encuentran: alteraciones en la permeabilidad selectiva de la membrana o la pérdida de función de enzimas clave para la célula (Mañas y Pagán, 2005).

En el caso de los tratamientos por calor, se ha intentado identificar a estructuras y procesos específicos cuya alteración lleva a la inactivación celular. Sin embargo, la mayoría de autores concluyen que la inactivación microbiana por calor es un fenómeno que ocurre por la alteración múltiple de estructuras y funciones (Miles, 2006). Por ejemplo, la desestabilización de ribosomas para la síntesis de proteínas puede ocurrir como un efecto secundario por la pérdida de magnesio (Mg) provocada por un daño térmico en la membrana. Cabe destacar que el  $Mg^{2+}$  es un ion necesario para estabilizar la estructura de los ribosomas, las chaperonas o el DNA (Niven et al., 1999; Cebrián et al., 2017).

El daño a la membrana microbiana debido a la exposición a un campo eléctrico se ha considerado durante décadas como una causa directa de la inactivación celular (Sale y Hamilton, 1967). La electroporación puede definirse como la formación de poros en la membrana celular gracias a la aplicación de un campo eléctrico externo, permitiendo así, la salida del contenido celular y produciéndose la muerte de la célula. La teoría más aceptada para su explicación es la propuesta por Zimmermann (1986) donde compara a la membrana celular con un condensador. En su teoría explica que la diferencia de potencial de reposo ( $V_m$ ) a través de la membrana es de aproximadamente 10 mV (Figura 1, A). Sin embargo, cuando se aplica un campo eléctrico externo (E) se acumulan más cargas libres de carga opuesta en ambas caras de la membrana, aumentando la diferencia de potencial (V), y resultando en la compresión de la membrana (Figura 1, B). Posteriormente, si el campo eléctrico aplicado se aumenta y excede de un valor límite o umbral ( $V_c$ ), la membrana no puede resistir la compresión, formándose poros en ella. Si la superficie total de poros es más pequeña en comparación a la superficie de membrana total, la ruptura de la membrana es reversible, por tanto, esta puede volver a sellar sus poros (Figura 1, C). En contraposición, si se aumenta aún más el campo eléctrico junto con un tiempo de exposición prolongado, se producirá un incremento en la superficie total de poros, la cual será mayor que la superficie total de

la membrana, dando lugar a la formación de poros irreversibles o a la destrucción de la membrana celular (Figura 1, D).



**Figura 1.** Diagrama representativo de las diferentes etapas en la electroporación (A, B, C y D) (Roohinejad et al., 2018).

Según Tsong (1990), la exposición a un campo eléctrico supone la compresión y la formación de poros en la membrana por la reorientación de los fosfolípidos de membrana, así, se incrementa la permeabilidad generando un desequilibrio osmótico, que lleva finalmente a la ruptura de la membrana y a la muerte celular. Cabe destacar que el tamaño y la cantidad de poros que se formen dependen de la intensidad del campo eléctrico aplicado y del tiempo de duración del tratamiento (Mañas y Pagán, 2005).

### 1.1.1. Daño subletal, adaptación a estreses y resistencia microbiana

Anteriormente se comentó que la pérdida de viabilidad de una célula no se debe normalmente a un solo evento sino más bien a un conjunto de lesiones simultáneas. Debido a ello, existen microorganismos con daños subletales que son capaces de sobrevivir a la acción letal de los tratamientos de inactivación. Esto lo consiguen reparando el daño que se les ha producido si las condiciones ambientales son las adecuadas. Por consiguiente, la detección y caracterización de los daños subletales es de gran importancia para la optimización de los procesos de conservación (Mackey, 2000).

Adicionalmente, la exposición a estreses subletales puede desencadenar respuestas de adaptación y resistencias en los microorganismos (Wu et al., 2020). En bacterias Gram-negativas el factor sigma ( $\sigma^s$ ) está implicado en la transcripción de más de 50 genes de resistencia a estrés osmótico, oxidativo, ácido o por calor, entre otros (Huisman et al., 1996). En el caso de las bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* también se ha descrito un factor sigma alternativo (sigB) con funciones fisiológicas similares (Abee y Wouters, 1999). Ambos factores se inducen como consecuencia a la exposición a estrés y la función principal ejercida es unirse a la región core de la RNA polimerasa confiriendo especificidad por promotores de genes implicados en los mecanismos de resistencia (Mañas y Pagán, 2005).

En general, las esporas bacterianas son consideradas las formas más resistentes a estreses físicos (Wouters et al., 2001). Además, las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las bacterias Gram-negativas y esto es debido a la mayor rigidez de sus membranas. En el caso de las levaduras y mohos la resistencia es bastante variable y, en general, su resistencia a la radiación es mayor que en bacterias que no presentan esporulación. Sin embargo, se ha demostrado que las levaduras son más sensibles a los tratamientos por PEF (Pulsed electric fields, campos eléctricos pulsados) que las bacterias, ya que son necesarias fuerzas de campo eléctrico menores para inactivar levaduras (Sale y Hamilton, 1967). Asimismo, el tamaño y la forma celular tienen un papel importante en la resistencia a estreses. Como norma general, a menor tamaño celular mayor resistencia a tratamientos como los ultrasonidos, HHP (High Hydrostatic Pressures, altas presiones hidrostáticas) o PEF (Mañas y Pagán, 2005). Por último, también se ha descrito la existencia de variabilidad entre cepas de microorganismos de la misma especie a los que se les ha realizado el mismo tratamiento. Por ejemplo, en un experimento con 9 cepas diferentes de *L.monocytogenes*, sometidas a tratamientos PEF idénticos, se observó que las mismas mostraron sensibilidades significativamente diferentes al tratamiento (Lado y Yousef, 2003).

## **1.2. Métodos convencionales de inactivación microbiana**

### Tratamientos térmicos

El procesado térmico de los alimentos es considerado uno de los métodos de conservación más antiguos en la industria alimentaria. Esto se debe a la capacidad del calor para la inactivación de la mayoría de microorganismos y de enzimas presentes en los alimentos (Cebrián et al., 2017; Smelt y Brul, 2014; O'Donnell et al., 2010). Es por ello que los tratamientos térmicos pueden utilizarse para inactivar células vegetativas, esporas microbianas, levaduras y mohos. Además, es importante definir la fisiología de la inactivación por calor de los microorganismos con el objetivo de optimizar los tratamientos térmicos. Así, podrían obtenerse productos que conserven mejor sus propiedades nutricionales, cumpliendo con las demandas de los consumidores (Cebrián et al., 2017).

El procesado térmico de los alimentos consiste en el calentamiento a una temperatura dada y mantenida durante un determinado periodo de tiempo. La energía térmica (o calor) que se transmite durante este proceso permite la desnaturalización de proteínas o la fusión de lípidos, entre otros efectos, con el objetivo de la inactivación microbiana y enzimática (Augusto et al., 2018). Por otro lado, los microorganismos son más resistentes al calor seco que al calor húmedo. En el caso del calor seco la inactivación tiene lugar por oxidación, sin embargo, el calor húmedo actúa principalmente en la desnaturalización de proteínas y en el daño a las membranas (Smelt y Brul, 2014).

El grado de resistencia al calor de diferentes grupos de microorganismos varía drásticamente debido a las diferencias en su estructura, composición o por los mecanismos de resistencia que puedan desarrollar los mismos. Se sabe que las células que se encuentran en fase estacionaria son más resistentes puesto que están expuestas

a condiciones de estrés. Adicionalmente, la presencia en el medio de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  favorecen la resistencia de las esporas a los tratamientos térmicos (Smelt y Brul, 2014).

Los tratamientos térmicos (o por aplicación de calor) pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de su intensidad y su objetivo de inactivación. Por un lado, se encuentran los tratamientos de pasteurización, donde se alcanzan temperaturas entre 65-100°C, que se basan en la inactivación de células vegetativas de patógenos, para extender la vida útil del producto alimentario (durante unos días a meses), siempre que este se mantenga en refrigeración. Por otro lado, la esterilización consiste en la aplicación de temperaturas superiores a 100°C para preservar alimentos que se mantienen en condiciones de temperatura ambiente durante periodos de tiempo mayores (de meses a años). Estos tratamientos permiten la inactivación de muchas esporas microbianas, enzimas y toxinas presentes en los alimentos que pueden llegar a contaminarlos y descomponerlos. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos procesados suponen una pérdida significativa de nutrientes y de las propiedades organolépticas de los productos alimentarios (Augusto et al., 2018; Cebrián et al., 2017). Además, también presentan la desventaja de precisar de un consumo de energía elevado (Augusto et al., 2018).

Por ejemplo, durante el procesado de la leche se pueden emplear diferentes tratamientos térmicos para garantizar la seguridad microbiológica. Por un lado, se pueden realizar los tratamientos de esterilización a temperaturas ultra altas (UHT) de 135 a 145°C durante 2-4 s. Por otro lado, se pueden realizar tratamientos a temperaturas altas durante tiempos cortos (HTST) donde la leche se calienta a un mínimo de 72°C durante 15 s. Los efectos de estos tratamientos en los componentes de la leche son variables dependiendo de la intensidad del tratamiento. Sin embargo, habitualmente, los tratamientos térmicos más intensos están más relacionados con cambios indeseables en el color, la textura o las propiedades nutricionales (por ejemplo: con la pérdida de aminoácidos esenciales) de la leche (Nunes y Tavares, 2019).

También, los microorganismos pueden deteriorar productos como los zumos de naranja, limón o manzana (que tienden a presentar pH ácidos, menores a 3,7). En este tipo de productos, los tratamientos térmicos de pasteurización se basan en la destrucción de bacterias no esporuladas del género *Lactobacillus* o *Leuconostoc*, levaduras y mohos. Por otro lado, en zumos se debe evitar el crecimiento de hongos ya que pueden producir micotoxinas. Para ello, las esporas y las células vegetativas de la mayoría de hongos deben inactivarse con tratamientos de 5 min a 60°C. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que existen excepciones, ya que ciertas cepas de mohos producen ascosporas que precisan de un mayor tiempo de tratamiento para su inactivación (Ağcam et al., 2018).

En los tratamientos térmicos la relación entre el número de microorganismos que sobreviven y el tiempo de exposición a una temperatura constante es exponencial. Con el objetivo de definir el efecto de un tratamiento térmico, se puede emplear el parámetro  $D_T$ . Este se corresponde con el tiempo de exposición a una temperatura dada, que es requerido para reducir la población microbiana en un ciclo logarítmico (ciclo  $\text{Log}_{10}$ ). También puede definirse como el tiempo necesario para inactivar el 90% de la población microbiana inicial. Por otro lado, también es necesario considerar el valor  $z$ , que hace

referencia al incremento de temperatura para reducir el valor  $D_T$  en un ciclo  $\text{Log}_{10}$ . Ambos parámetros,  $D_T$  y  $z$ , pueden utilizarse para comparar la resistencia al calor de diferentes microorganismos y en diferentes condiciones experimentales (Ağçam et al., 2018; Cebrián et al., 2017).

Actualmente, se está trabajando en la combinación de tecnologías emergentes con tecnologías térmicas convencionales, con el objetivo de mejorar la calidad del producto, reduciendo el costo e impacto medioambiental del procesado.

### **1.3. Tecnologías emergentes de inactivación microbiana**

La demanda de productos mínimamente procesados ha incrementado en los últimos años, debido a que estos recuerdan a productos frescos que conservan mejor sus características nutricionales, aroma y sabor (Oey et al., 2008). Como resultado, la industria alimentaria ha mostrado su interés en el desarrollo de nuevas tecnologías no-térmicas de inactivación microbiana. Cabe destacar que su aplicación no solo se centra en el sector alimentario, sino que también tiene aplicabilidad en industria farmacéutica.

Existen tecnologías físicas como las altas presiones hidrostáticas (HHP); tecnologías electromagnéticas como los campos eléctricos pulsados (PEF), el calentamiento óhmico (OH, Ohmic heating), las microondas (MW, Microwave), las radiofrecuencias (RF), el plasma frío (CP, Cold plasma), la radiación ultravioleta (radiación UV); tecnologías acústicas como los ultrasonidos; y otras tecnologías como la filtración a través de membranas (MF, Membrane filtration) o el  $\text{CO}_2$  supercrítico (SC- $\text{CO}_2$ , Supercritical  $\text{CO}_2$ ) (Barba et al., 2018). Seguidamente, se describirán algunas de ellas.

Las HHP se basan en la aplicación de presiones entre 100-600 MPa. En este procesado, los productos sometidos por un medio líquido (normalmente agua) a presiones ultra altas, se colocan en un recipiente hermético que está aislado térmicamente. Así, la presión aplicada al producto se produce de forma instantánea y uniforme. Durante la etapa de compresión (presurización) se produce un aumento de la temperatura, aunque se controla para no exceder de  $30^\circ\text{C}$  y no afectar a componentes de los productos alimentarios. Además, este procesado puede realizarse a temperatura ambiente, reduciendo el consumo de energía que sí es requerido en tratamientos térmicos convencionales para el calentamiento (Huang et al., 2020).

La exposición a altas presiones puede producir daños en las membranas de los microorganismos, alterando la permeabilidad celular y el intercambio de iones. De esta forma, se puede producir la salida del contenido celular y, por tanto, la muerte celular (Niakousari et al., 2018). Esta tecnología ha mostrado su eficacia en inactivación de bacterias, levaduras y mohos. Aunque cabe destacar que la reducción microbiana depende de la presión, el tiempo, la temperatura o las características del producto, entre otras causas (Jadhav et al., 2021). Por ejemplo, Bulut y Karatzas (2021) evaluaron el efecto de las HHP a diferentes pH (3,2, 4,5 y 5,8) para la inactivación de *E.coli K12* en zumo de naranja, el cual previamente había sido congelado a una temperatura de  $-80^\circ\text{C}$ . Para ello, utilizaron una presión de 250 MPa durante 15 min y a una temperatura de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  antes del inicio del tratamiento por HHP, obteniéndose una reducción logarítmica de 4,88, 4,15 y 4,61 CFU/mL, respectivamente. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta

que el tratamiento por HHP produjo una reducción de 0,35 y 0,42 reducciones logarítmicas en muestras de zumo de naranja, que no habían sido congeladas previamente, a pH 4,5 y 5,8, respectivamente.

Esta tecnología ha sido aprobada por entidades como la FDA o el Departamento de Agricultura de EEUU (*U.S. Department of Agriculture* (USDA)) como una pasteurización comercial para la inactivación microbiana en alimentos (Wang et al., 2015). Sin embargo, aunque ya se han comercializado productos procesados con esta tecnología, todavía son escasos, debido a los problemas técnicos en la construcción de unidades de HHP adecuadas para el tratamiento de volúmenes elevados (Jadhav et al., 2021). Adicionalmente, las HHP también se están empleando con el objetivo de la extracción de compuestos antioxidantes, fenólicos, bioactivos y funcionales de varias fuentes, sugiriendo su aplicación en el sector farmacéutico, de salud o nutracéutico (Jadhav et al., 2021).

Los campos eléctricos pulsados (PEF) consisten en la aplicación de pulsos de alto voltaje con una intensidad de campo eléctrico comprendida entre 20-80 kV/cm, durante un corto periodo de tiempo (de varios nanosegundos a varios milisegundos), para evitar calentar los alimentos, que están situados entre dos electrodos (Zhang et al., 2019). Es una tecnología eficaz para inactivar microorganismos a bajas temperaturas en alimentos fluidos o semifluidos, que pueden ser bombeados (Aadil et al., 2015). El mecanismo por el cual se produce la inactivación microbiana es principalmente por la inducción de la ruptura eléctrica (por electroporación) de las membranas celulares, como se comentó anteriormente.

En este caso, la intensidad de campo eléctrico, la temperatura, la duración de los pulsos, la forma, el número de pulsos, la densidad de energía, la frecuencia, el tipo de producto (zumos, leche, etc.) (su conductividad, pH o  $a_w$ ) o el estado de los microorganismos que se encuentren en el producto, entre otros parámetros, influyen en el procesado por PEF (Toepfl et al., 2014). Para esta tecnología, existen microorganismos más resistentes que otros, ya que las bacterias Gram positivas y negativas tienden a ser más resistentes que las levaduras. Por otro lado, las esporas bacterianas y las ascosporas de hongos son consideradas las formas más resistentes a estos tratamientos (Wouters et al., 2001). Por último, uno de los principales problemas de esta tecnología PEF es el costo de la inversión inicial, sin embargo, los costes de operación son menores que en los tratamientos térmicos convencionales (Barbosa-Cánovas y Altunakar, 2006).

El calentamiento óhmico (OH) se basa en la inactivación microbiana por mecanismos térmicos. Sin embargo, el principio físico involucrado es diferente al del calentamiento térmico convencional. En este caso, una corriente eléctrica alterna pasa a través del producto, este, es colocado en una celda óhmica con dos electrodos, así, el producto actúa como una resistencia eléctrica generando energía térmica por efecto Joule (Müller et al., 2020).

En el calentamiento térmico convencional, se producen gradientes de temperatura dentro del producto, es por ello, que pueden existir regiones frías y regiones más sobrecalentadas. Estas zonas más calientes dentro del producto, pueden provocar la pérdida de compuestos termosensibles de interés como la vitamina C y el calcio. Por el



contrario, en el OH, el producto se calienta de forma más uniforme, ya que se genera calor de forma volumétrica (Müller et al., 2020). Sin embargo, esta tecnología presenta algunas limitaciones como el sobrecalentamiento, la pérdida de material de los electrodos (por la corrosión de los mismos a ciertas frecuencias) y la dependencia de la conductividad eléctrica de los productos tratados (Kaur y Singh, 2016).

El plasma frío es una tecnología que presenta diversas aplicaciones, por ejemplo, en el sector biomédico se utiliza para la esterilización en frío de instrumentos y prótesis (Thirumdas et al., 2015). Por otro lado, también se emplea para la degradación de toxinas o para la modificación de envases de productos alimentarios (Pankaj y Keener, 2017).

El plasma es el cuarto estado de la materia, este estado se alcanza cuando un gas se encuentra ionizado *quasi* neutral, de esta forma se compone de iones, electrones libres, átomos y moléculas en su estado excitado con una carga neta neutra. El plasma puede ser generado por cualquier tipo de energía que pueda ionizar gases, por ejemplo, la energía eléctrica o la térmica, la luz UV, la radiación gamma o la de rayos X (Pankaj et al., 2018). Así, en el plasma pueden generarse especies reactivas que pueden interferir con los microorganismos presentes en los alimentos. En el caso del plasma frío se ha reportado que las especies reactivas del oxígeno presentes en el plasma son un factor clave en la inactivación microbiana, ya que producen unas condiciones de estrés oxidativo, que llevan a la peroxidación de lípidos, la inactivación de enzimas y la ruptura del DNA (Pankaj y Keener, 2017).

La radiación ultravioleta es la radiación en el rango de 100-400 nm en el espectro electromagnético. Se distinguen 4 subtipos de radiación UV: UV de vacío (100-200 nm), UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315 nm) y los UV-A (315-400 nm) (Delorme et al., 2020). Los rayos UV-C tienen un papel germicida ya que actúan sobre bacterias, protozoos, hongos y algas (Shin et al., 2016). La radiación UV-C es una tecnología considerada como segura y no tóxica, además requiere de un bajo coste de inversión y mantenimiento (Delorme et al., 2020). Los equipos comerciales de rayos UV fueron fabricados en los inicios para industrias farmacéuticas donde no es posible la desinfección química. Posteriormente, emergió su aplicación en industrias alimentarias para prevenir los efectos negativos de los tratamientos térmicos convencionales (López-Malo y Palou, 2005).

La radiación UV permite dañar el DNA de los microorganismos (por la formación de dímeros de pirimidina), alterando su metabolismo y replicación, llevando así, a la muerte celular. Adicionalmente, la elección correcta de la fuente de rayos UV es importante para incrementar la eficiencia de la inactivación microbiana (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Las fuentes comerciales de rayos UV son lámparas de mercurio de baja y media presión, la luz UV pulsada (PL) y diodos que emiten luz (LEDs) (Delorme et al.; 2020).

Los efectos que permiten la inactivación microbiana dependen principalmente de la dosis UV ( $J/m^2$ ) (esta depende de la intensidad y el tiempo de exposición) y de la longitud de onda. No obstante, las características de los microorganismos (fase de crecimiento, cepa, condiciones de recuperación, etc.) o ciertas características de los productos a

tratar (como el color, la viscosidad, la turbidez o la densidad) influyen en la capacidad de inactivación (Delorme et al., 2020).

Los ultrasonidos se basan en ondas elásticas que se originan por la transferencia de energía de unas partículas a otras, las cuales oscilan en un medio de propagación. Las ondas presentan una alta frecuencia de 20 kHz-10 MHz, excediendo el límite de escucha del oído humano (Gallo et al., 2018). Los ultrasonidos pueden clasificarse en dos categorías principalmente, de baja potencia con frecuencias altas (de 100 kHz a mayores) o de alta potencia con frecuencias bajas (de 20 a 100 kHz). En el caso de la inactivación microbiana se hace uso de los ultrasonidos de alta potencia (HPU) y para su aplicación es necesario la presencia de una fase líquida (Sango et al., 2014).

Esta tecnología permite la inactivación de microorganismos por el fenómeno de cavitación acústica. Durante la cavitación, se produce la formación, crecimiento y colapso de burbujas de gas en el medio, generando zonas de alta temperatura (hasta 5000°C) y alta presión (hasta 1000 atmósferas). Aparte de estas altas temperaturas y presiones, se generan ondas de alta energía mecánica y turbulencia (Patist y Bates, 2008). Asimismo, las burbujas de gases en presencia de altas presiones y temperatura se transforman en especies reactivas y en radicales libres. Finalmente, este fenómeno generado por los ultrasonidos produce la ruptura de la envuelta celular, produciendo la salida del contenido celular, y de esta manera, la muerte de los microorganismos (Sango et al., 2014).

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) supercrítico ( $\text{SC-CO}_2$ ) utiliza la presión en combinación con  $\text{CO}_2$  para la inactivación microbiana sin afectar al contenido nutricional, ni a las propiedades organolépticas de compuestos bioactivos de productos alimentarios y de la salud. Sin embargo, los altos costes de los equipos y de los sistemas de operación son una limitación en su aplicación a escala industrial (Amaral et al., 2017).

El término supercrítico hace referencia a una sustancia en un fluido monofásico y sin condensación que se eleva por encima de su temperatura y presión críticas ( $T_c$ ,  $P_c$ ). De esta forma, la sustancia muestra propiedades de gases y líquidos: con una alta densidad, difusividad intermedia y baja viscosidad y tensión superficial (Silva y Meireles, 2014). Los valores de alta densidad combinados con el poder disolvente dependiente de la presión proporcionan una alta solubilidad. Además, los bajos valores de viscosidad y los valores intermedios de difusividad combinados con la ausencia de tensión superficial permiten la rápida penetración de estos fluidos en las células, provocando la liberación de los componentes del interior celular. Así, se facilita la inactivación de células vegetativas (Amaral et al., 2017).

En este caso, se emplea el  $\text{CO}_2$ , ya que su baja  $T_c$  (31,04°C) y su  $P_c$  moderada (7,38 MPa) permite la aplicación de temperaturas próximas a la temperatura ambiente sin afectar a compuestos termosensibles de los productos alimentarios y farmacéuticos. Asimismo, el  $\text{CO}_2$  es considerado un solvente inerte químicamente, barato, no tóxico, no inflamable, no corrosivo y que puede reutilizarse (Amaral et al., 2017). Además, a diferencia de las HHP esta tecnología es igual de eficiente a menores presiones (se precisa de presiones entre 10-20 MPa en la tecnología de  $\text{SC-CO}_2$ ) (Ceni et al., 2016).

La combinación de algunas de estas tecnologías puede ser de interés para obtener productos más seguros. En el estudio de Gomez-Gomez et al. (2021), se combinaron las tecnologías SC-CO<sub>2</sub> y ultrasonidos de potencia (HPU) con el objetivo de la inactivación de esporas bacterianas (*Clostridium butyricum*) y de hongos (*A.niger*) en una emulsión. Esto es debido a que estas tecnologías por separado necesitan de la aplicación de presiones y temperaturas elevadas durante más tiempo para la inactivación. Por este motivo, componentes de interés del medio se pueden ver afectados. En este caso, se observó una reducción en el tiempo de procesado para la inactivación de esporas de *C.butyricum* al combinar ambas tecnologías.

### Campos eléctricos moderados (MEF)

Para explicar el fundamento de la tecnología MEF se debe tener en cuenta que cuando una corriente eléctrica atraviesa un material, parte de la energía cinética de los electrones se transforma en calor debido a los choques que sufren éstos con los átomos del material por el que circulan, produciendo una elevación de la temperatura del mismo (esto es conocido como efecto Joule). Su aplicación práctica consiste en hacer pasar una corriente alterna a través del alimento mediante contacto directo con dos electrodos (Prósper, 2020). A diferencia con el calentamiento óhmico, el objetivo no será calentar sino emplear una temperatura moderada para evitar efectos térmicos indeseables sobre los productos.

Esta tecnología se basa en la aplicación de campos eléctricos comprendidos entre 1 V/cm a 1 kV/cm manteniendo la temperatura del producto relativamente baja (aproximadamente <100°C). También se hace uso de frecuencias y formas de onda arbitrarias, que pueden ser triangulares, cuadradas o sinusoidales (Gavahian y Tiwari, 2020). Su capacidad para la inactivación microbiana reside en el fenómeno de electroporación o permeabilización junto con el efecto térmico. Por añadidura, entre algunas de las aplicaciones de esta tecnología se encuentran: la mejora en la extracción de componentes celulares o el acortamiento de la fase *lag* de microorganismos para mejorar procesos de fermentación (la fase *lag* o de latencia, es el periodo que el microorganismo necesita para adaptarse al medio en el que se encuentra) (Sastry, 2008).

Estos sistemas cuentan con los siguientes componentes básicos: una fuente de alimentación, electrodos, una celda de tratamiento, una fuente de almacenamiento de datos y una sonda de temperatura (termopar) (Gavahian et al., 2018).

#### **1.3.1. Ventajas del uso de tecnologías emergentes**

En general, el desarrollo de tecnologías no térmicas tienen los siguientes objetivos: la mejora de la seguridad y la calidad de los productos y el ahorro en los costes mediante la reducción de la energía empleada y los tiempos de procesado (Lavilla y Gayán, 2018).

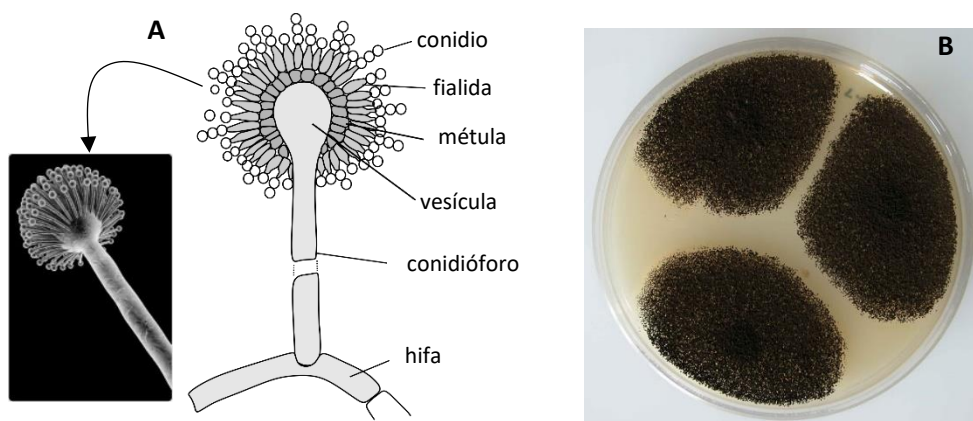
Adicionalmente, con estas tecnologías es posible también el desarrollo de nuevos alimentos teniendo en consideración las preferencias y la aceptación de los productos por parte de los consumidores (Knorr y Augustin, 2021).

## 1.4. Hongos como diana de inactivación microbiana

Los hongos tienen un papel importante en varios ecosistemas y son utilizados para la producción de diferentes tipos de alimentos, bebidas, enzimas, antibióticos y compuestos farmacéuticos (Demain y Martens, 2017). A su vez, son los responsables de la descomposición de alimentos y otros productos. Incluso, son capaces de producir metabolitos dañinos (normalmente proteínas) que causan reacciones alérgicas y enfermedades respiratorias (Portnoy y Jara, 2015). Especialmente el peligro se centra en aquellas especies que producen micotoxinas (muchas de ellas son carcinogénicas, inmunosupresoras, disruptoras del sistema endocrino y neurotoxinas) (Hojnik et al., 2019).

Los hongos son organismos eucariotas que pueden ser unicelulares o pluricelulares. A excepción de las levaduras unicelulares, la mayoría crecen en forma de filamentos, estos filamentos son conocidos como hifas, que pueden contener una o más células (Figura 2, A). Además, una gran cantidad de hifas forman el micelio (CK-12, 2021).

El género *Aspergillus* hace referencia a un hongo filamentoso, hialino (transparente o translúcido), saprófito (se alimenta de materia orgánica en descomposición), que pertenece al filo *Ascomycota*. Además, puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios). Entre algunas especies del género se encuentran: *A.niger*, *A.flavus*, *A.ochraceus*, *A.terreus*, *A.oryzae* o *A.niveus*, entre otras. Estas se diferencian por el tamaño, la tasa de crecimiento, la textura y el color de la colonia. Por ejemplo: las colonias de *A.niger* presentan un color negro (Figura 2, B) mientras que las de *A.flavus* verde-amarillento. Este género es uno de los principales productores de micotoxinas, estas moléculas son metabolitos secundarios que se producen y se secretan durante la degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos (INSST, 2012).



**Figura 2.** Estructura del hongo *A. niger* (A). Forma de las colonias sembradas en medio sólido (B).

En *A.niger*, tras el crecimiento vegetativo de las hifas, pueden crecer hifas aéreas en condiciones aerobias. Estas hifas aéreas, también conocidas como conidióforos van creciendo hasta que en la punta se hinchan, formando la vesícula. Posteriormente se

forman brotes que dan lugar a las métulas. Las fialidas se forman en la parte superior de las métulas. Finalmente, tras las fialidas se forman cadenas de conidios (Figura 2, A) (Krijghsheld et al., 2013). Estos conidios son esporas a través de las cuales este tipo de hongos pueden reproducirse asexualmente.

En cuanto a resultados en la inactivación de esporas de hongos, Raso et al. (1998) estudiaron la inactivación mediante PEF de conidiosporas de *Byssochlamys fulva* y ascosporas de *Neosartoria fischeri* suspendidas en diferentes tipos de zumos. Los resultados mostraron como la inactivación de las conidiosporas dependían notablemente del tiempo de tratamiento ( $t = \text{número de pulsos} * \text{amplitud del pulso}$ ) y del tipo de zumo. En este caso, en el zumo de arándanos a un voltaje input de 30 kV, una frecuencia de 2 Hz y un campo eléctrico de 36,5 kV/cm se consiguió casi 6 ciclos logarítmicos de reducción tras 2 pulsos. Sin embargo, en zumo de tomate en las mismas condiciones, únicamente se obtuvo una reducción de 1 ciclo logarítmico. En cambio, las ascosporas de *N.fischeri* suspendidas en el zumo de arándanos no se inactivaron con PEF incluso tras 40 pulsos a un campo eléctrico de 51 kV/cm. Una explicación a la resistencia de las ascosporas frente a estos tratamientos por PEF es debido a su estructura. Pues, la formación de un espacio grueso entre la pared celular y la membrana plasmática de las ascosporas, se ha considerado un factor que influye en la resistencia a tratamientos por calor e incluso para tratamientos por PEF (Partsch et al., 1969).

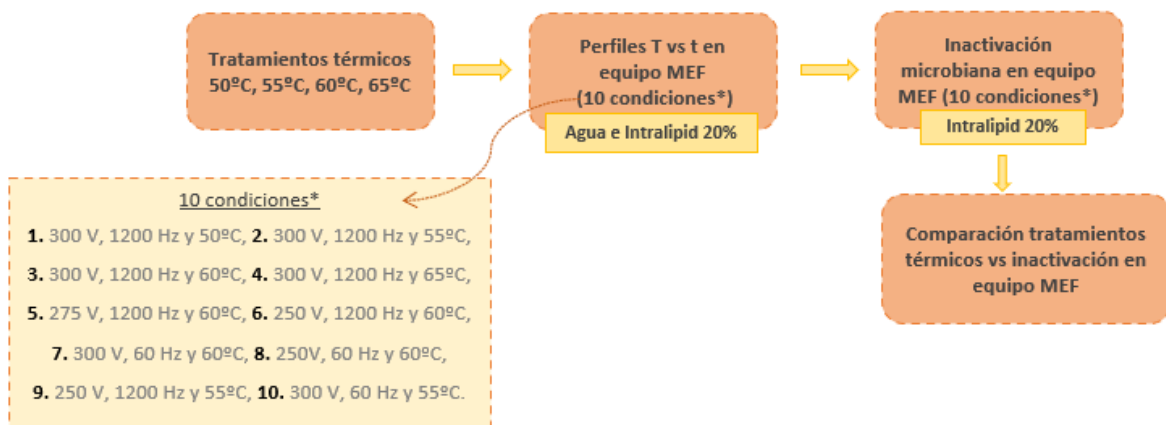
Por otro lado, el plasma frío (CP) puede actuar rápidamente a temperatura ambiente y sin dejar residuos químicos, con el propósito de inactivar hongos y micotoxinas en la superficie de alimentos como granos, nueces, especias, hierbas, carnes secas y pescado (Misra et al., 2019).

## 2. OBJETIVO Y PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL

El objetivo general del presente TFG fue evaluar la eficacia de la tecnología de los campos eléctricos moderados (MEF), en la inactivación microbiana en una emulsión lipídica de agua en aceite. Para la consecución del mismo se planteó la siguiente planificación experimental (Figura 3):

- Realizar tratamientos térmicos convencionales a diferentes T (50°C, 55°C, 60°C y 65°C), obteniendo datos de inactivación microbiana a diferentes tiempos (0, 2, 3, 5, 10 y 15 min). Los datos de inactivación microbiana se obtuvieron realizando diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) y sembrando las diluciones a cada tiempo en cada uno de los tratamientos térmicos realizados.
- Posteriormente, en el equipo MEF se obtuvieron los perfiles de calentamiento (T vs t) de agua y del medio Intralipid 20%. Se realizaron 10 condiciones distintas (con diferentes tensiones o voltajes, frecuencias y T). Las condiciones fueron las siguientes:
  - ✓ Condición 1: 300 V, 1200 Hz y 50°C.
  - ✓ Condición 2: 300 V, 1200 Hz y 55°C.

- ✓ Condición 3: 300 V, 1200 Hz y 60°C.
  - ✓ Condición 4: 300 V, 1200 Hz y 65°C.
  - ✓ Condición 5: 275 V, 1200 Hz y 60°C.
  - ✓ Condición 6: 250 V, 1200 Hz y 60°C.
  - ✓ Condición 7: 300 V, 60 Hz y 60°C.
  - ✓ Condición 8: 250 V, 60 Hz y 60°C.
  - ✓ Condición 9: 300 V, 60 Hz y 55°C.
  - ✓ Condición 10: 250V, 1200 Hz y 55°C.
- Posteriormente, se procedió a la evaluación de la inactivación microbiana en las 10 condiciones diferentes. Al igual que en los tratamientos térmicos convencionales, los datos de inactivación microbiana en el equipo MEF se obtuvieron realizando diluciones seriadas de las diferentes condiciones a diferentes tiempos. Seguidamente, se sembraron las diluciones y posteriormente, se realizó el recuento de colonias.
  - Se compararon los resultados de los tratamientos térmicos frente a los obtenidos en las 10 condiciones del equipo MEF, evaluando de esta manera la efectividad de esta tecnología en la inactivación microbiana.



**Figura 3.** Planificación experimental del trabajo realizado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Preparación de material

##### 3.1.1. Medio de emulsión

Se prepararon muestras con 60 mL de Intralipid 20% (Fresenius Kabi, Uppsala, Suecia) para los tratamientos térmicos y muestras de 100 mL de Intralipid 20% para los ensayos en el equipo MEF. Las muestras de medio se autoclavaron (Presoclave 75, J.P. Selecta, Barcelona, España). Posteriormente, se guardaron en refrigeración (aproximadamente 4°C) hasta su uso.

El medio Intralipid 20% consiste en una emulsión de agua en aceite con un contenido del 20% en aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,25% de glicerina y agua. También contiene hidróxido de sodio para ajustar el pH en un rango de 6 a 8,9.

Cabe destacar que este tipo de emulsión está indicada como una fuente de calorías y de ácidos grasos esenciales para pacientes que requieren de nutrición por vía parenteral (se introduce en el organismo por vía distinta a la digestiva, como la intravenosa, la subcutánea, la intramuscular, etc.). Además, es una fuente de ácidos grasos esenciales para la prevención de la deficiencia en este tipo de ácidos grasos (AEMPS, 2019; HVSP, 2021).

### **3.1.2. Preparación de la suspensión de esporas de *Aspergillus niger***

Se utilizó la cepa liofilizada de *Aspergillus niger* CECT 2807 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). El hongo *A.niger* se cultivó por siembra con asa de extensión (Labbox Labware S.L.; Barcelona, España) en Potato Dextrose Agar (PDA, Scharlab S.L.; Mas d'En Cisa, España) durante 7 días a 25°C. El contenido de PDA era de 4 g/L de peptona de patata, 20 g/L de glucosa y 15 g/L de agar a un pH de  $5,6 \pm 0,2$  a 25°C.

Tras el crecimiento, se procedió a su recogida con asa de extensión desde la superficie del agar con 10 mL de agua destilada con Tween 80 al 0,1% (v/v). La adición de Tween 80 al 0,1% se utilizó con el objetivo de la mejora en la recogida de esporas, puesto que actúa como surfactante hidrofílico, permitiendo la solubilización de aceites. La suspensión fue recogida en un recipiente estéril y posteriormente guardada a 4°C hasta su uso.

Finalmente, previo a cada tratamiento térmico se inocularon 5 mL de la suspensión de esporas de *A.niger* en el medio de emulsión Intralipid 20% (60 mL). Por otro lado, previamente a los ensayos en el equipo de MEF, el medio de emulsión Intralipid 20% (100 mL) era inoculado con 8,33 mL de la suspensión de esporas de *A.niger*. En este caso, se utilizó un mayor volumen de medio (y de suspensión de esporas) para que en la celda de tratamiento por MEF se alcanzasen las condiciones del ensayo de forma más homogénea en el medio inoculado. La concentración inicial promedio, tanto para los tratamientos térmicos como de MEF, fue de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL.

## **3.2. Tratamientos térmicos**

Los tratamientos térmicos para la emulsión inoculada con *A.niger* se realizaron a 50, 55, 60 y 65°C en un baño con agua donde se controlaba la temperatura (1811, Bunsen, Madrid, España). Se introducían 1,5 mL de muestra de medio inoculado ( $10^6$ - $10^7$  UFC/mL de *A.niger*) en tubos de vidrio de borosilicato de 8 mm de diámetro, 70 mm de longitud (Fiolax, DWK, Wertheim/Main, Alemania) (Figura 4). Los tubos se sacaban del baño a diferentes tiempos: 2, 3, 5, 10 y 15 min, en cada uno de los tratamientos térmicos (a excepción del tratamiento a 50°C donde solo se tomaron datos de los tiempos 0 y 15 min). Finalmente, los tubos se mantenían en hielo hasta que se procedía a realizar las diluciones seriadas.

### **3.2.1. Diluciones seriadas, siembras y recuentos**

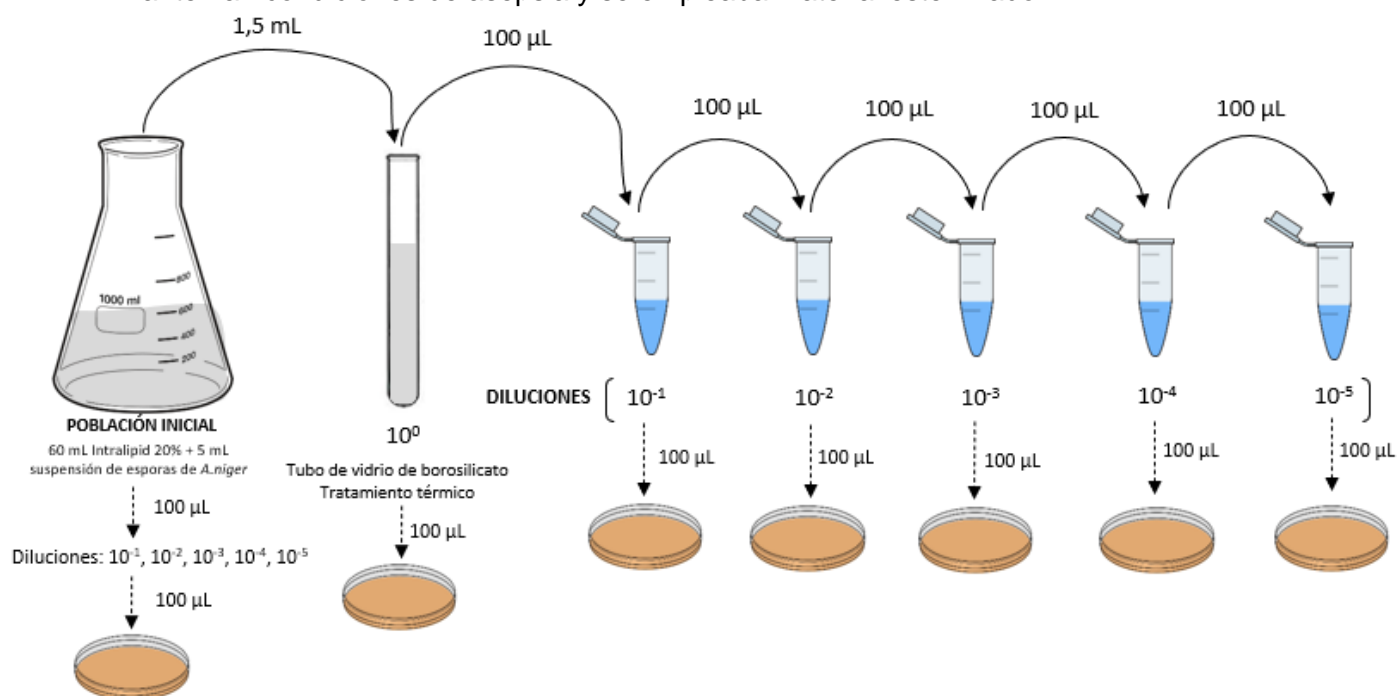
Se tomaban 100 µL del tubo de vidrio de borosilicato, para ello, se homogeneizaba previamente el contenido del tubo (por resuspensión con la micropipeta). A continuación,

se vertían los 100  $\mu\text{L}$  en un tubo Eppendorf con 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada autoclavada (dilución  $10^{-1}$ ). Posteriormente, se homogeneizaba bien el contenido y se tomaban 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-1}$  para introducirlos en el siguiente tubo con 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada autoclavada, correspondiente a la dilución  $10^{-2}$ . El paso anterior se repetía hasta realizar la dilución  $10^{-5}$  (Figura 4). Los tubos Eppendorf se rellenaron con 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada autoclavada para realizar las diluciones.

Por otro lado, también se realizan diluciones seriadas de la población inicial (Figura 4). Esta es necesaria para poder comparar con los datos de inactivación de las muestras tratadas.

Se tomaban 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones y se sembraban con un asa de extensión en placas Petri (Scharlab S.L.; Barcelona, España) con PDA. Las diluciones se sembraron en placas de PDA por triplicado, y estas se incubaban a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 4-5 días. Tras ello, se hacía el recuento de colonias formadas, en aquellas placas donde se podía contar correctamente (aproximadamente 1-60 colonias).

Finalmente, para la realización de las diluciones seriadas y las siembras siempre se mantenían condiciones de asepsia y se empleaba material esterilizado.



**Figura 4.** Esquema de diluciones seriadas y siembras para los tratamientos térmicos.

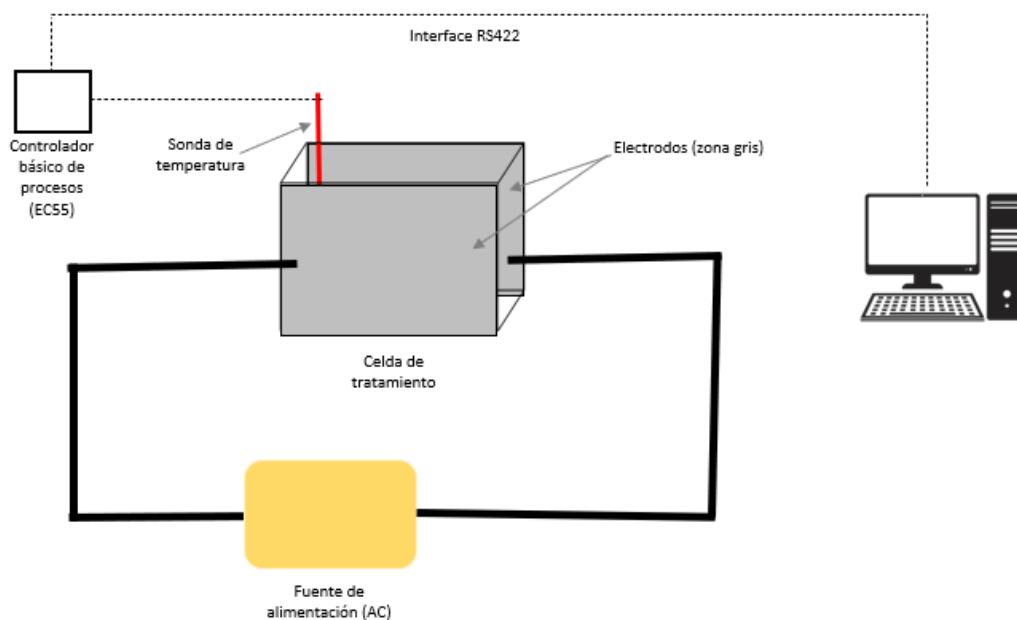
### 3.3. Equipo MEF

El equipo de MEF estaba formado por una fuente de alimentación de corriente alterna (AC) (BK Precision 9833, Adler Instrumentos S.L.; Madrid, España) y una celda de tratamiento de MEF (Figura 5) la cual estaba contenida dentro de una cabina de protección. Desde la fuente de alimentación pueden cambiarse los parámetros que se tendrán en cuenta en cada ensayo (la frecuencia (Hz) (con forma de onda sinusoidal) y el voltaje (V)). Los campos eléctricos aplicados fueron 37,5 V/cm, 34,38 V/cm y 31,25



V/cm. La celda tenía forma de paralelepípedo, con dos electrodos de acero (9 x 8 cm) separados por 8 cm entre ellos (las dimensiones interiores de la celda eran de 9x8x8 cm). El resto de la celda estaba fabricada en politetrafluoroetileno (teflón), el cual es resistente al calor. A su vez, la celda era colocada sobre un agitador magnético para una mejor homogeneización de la muestra.

Adicionalmente, el sistema contaba con una sonda de temperatura (pT100) para controlar este parámetro a lo largo de cada ensayo. La sonda de temperatura estaba conectada a un controlador básico de procesos (E5CC, Omron Electronics Iberia S.A.U., Madrid), que se comunicaba con un PC, mediante un interface RS422 (Figura 5). Desde el PC, mediante un programa de registro y control, elaborado en Visual Studio para la presente aplicación, era posible tanto el registro de la temperatura, como cambiar los parámetros de frecuencia y tensión del generador, así como activar o desactivar la aplicación de tensión en la celda (conexión PC-generador mediante interface RS422).



**Figura 5.** Esquema del equipo MEF empleado. AC: corriente alterna.

Previo a la realización de los ensayos, los medios de emulsión Intralipid 20% eran sacados del refrigerador (4°C) y utilizados cuando se alcanzaba la temperatura ambiente (25°C aproximadamente).

### 3.3.1. Curvas temperatura (T) vs tiempo (t)

Se utilizaron muestras de 100 mL de agua corriente y de la emulsión Intralipid 20% para obtener las curvas de temperatura en función del tiempo en el equipo MEF para 10 condiciones diferentes (Figuras 6 y 7). Previo a los ensayos, se utilizó un conductímetro (COND 50+ XS, LabProcess, Barcelona, España) para tomar datos de conductividad de ambos medios.

Posteriormente, los medios se introducían en la celda de tratamiento y se mantenían en agitación mediante un agitador magnético. En la fuente de alimentación del equipo MEF

se modificaban los parámetros de frecuencia y voltaje (mediante el programa de registro y control mencionado anteriormente), y, además, se introducía en el programa un valor de temperatura límite en cada ensayo. Las experiencias se realizaron por duplicado para el agua y la emulsión en cada una de las condiciones ensayadas.

La forma de operación del sistema consistía en la llegada a la temperatura establecida mediante la aplicación de la tensión y frecuencia fijadas (On). Seguidamente, si la temperatura excedía en más de 0,5°C la temperatura establecida, el sistema se apagaba (Off) mediante el programa de control y volvía a funcionar (On) cuando la temperatura estaba 0,5°C por debajo de la temperatura establecida. De esta manera, el sistema funcionaba en ciclos como se muestra en las curvas de la Figura 6, mostrando el comportamiento típico del control de una variable mediante un control todo-nada (On-Off).

### 3.3.2. Ensayos MEF con medio Intralipid 20% inoculado

Para estos ensayos, se utilizaba la celda de tratamiento tapada para evitar la contaminación. Asimismo, previo a la realización de cada experiencia se limpiaba exhaustivamente la celda con etanol de 96°.

En los 10 ensayos MEF para la emulsión inoculada con *A.niger* se tomaban muestras de 2 mL a diferentes tiempos: 5, 10 y 15 min (a excepción de la condición donde se alcanzaban 65°C, en la cual también se tomó muestra a los 3 min). Para la toma de muestras se esperaba a que el equipo alcanzase la temperatura fijada y después se contabilizaba el tiempo. Finalmente, los tubos se mantenían en hielo hasta que se procedía a realizar las diluciones seriadas.

#### Diluciones seriadas, siembras y recuentos

Se realizaron los mismos pasos que los mencionados en el apartado 3.2.1. La única diferencia era que la dilución final a la que se llegaba era de 10<sup>-4</sup>. Las siembras se realizaron por triplicado en placas con PDA para cada una de las diluciones y a cada tiempo.

### 3.4. Inactivación de *A.niger*

Tras el recuento de colonias, se realizaba el cálculo para obtener el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (Ecuación 1, UFC/mL).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias} * 10^{\text{número de la dilución}}}{0,1} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde: 0,1 son 0,1 mL ó 100 µL tomados para realizar la primera dilución.

La inactivación microbiana se expresó en ciclos logarítmicos, tal como indica la Ecuación 2. Esta ecuación es utilizada si la inactivación del ensayo no es completa. Si, por el contrario, el ensayo mostraba inactivación completa se utilizaba la Ecuación 3.

$$\text{Inactivación parcial } (\log_{10}) = \log_{10} \left( \frac{N}{N_0} \right) \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Inactivación total } (\log_{10}) = -\log_{10} (N_0) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde: N es la población de *A.niger* presente en la muestra tras el tratamiento (UFC/mL) y N<sub>0</sub> (o población inicial) es la población de *A.niger* presente en la muestra previamente al tratamiento (UFC/mL).

### 3.5. Análisis estadístico

Se empleó el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., Virginia, USA) para realizar ANOVA multifactoriales, determinando así, si la aplicación de campos eléctricos, el voltaje y la frecuencia, son parámetros estadísticamente significativos en la inactivación de *A.niger* en una emulsión.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Curvas temperatura (T) vs tiempo (t)

Previamente a realizar los ensayos con ambos medios se midió la conductividad del agua de la red y de la emulsión de agua en aceite al 20%. La conductividad eléctrica ( $\sigma$ ) hace referencia a la movilidad de cargas eléctricas que existe en una sustancia o material (Silva et al., 2017). Para el agua, la conductividad promedio resultó de  $1,02 \pm 0,07$  mS/cm. Para la emulsión, fue de  $0,37 \pm 0,02$  mS/cm.

En agua, a medida que se aumentaba el voltaje en el equipo de MEF (de 250 V a 300 V), disminuía el tiempo para llegar hasta la temperatura establecida (Tabla 1, Figura 6). Igualmente ocurría con la emulsión Intralipid 20% (Tabla 1, Figura 7), sin embargo, los datos muestran que, en el ensayo de 60°C, 275 V y 1200 Hz el tiempo para alcanzar la T establecida fue menor (4,97 min) en comparación al ensayo de 60°C, 300 V y 1200 Hz (5,6 min). A pesar de lo anterior, la condición de 60°C, 250 V y 1200 Hz refleja un tiempo considerablemente mayor para alcanzar la T establecida (9,13 min), por ello, es probable que el valor de tiempo tan bajo para la condición 60°C, 275 V y 1200 Hz sea debido a un error experimental.

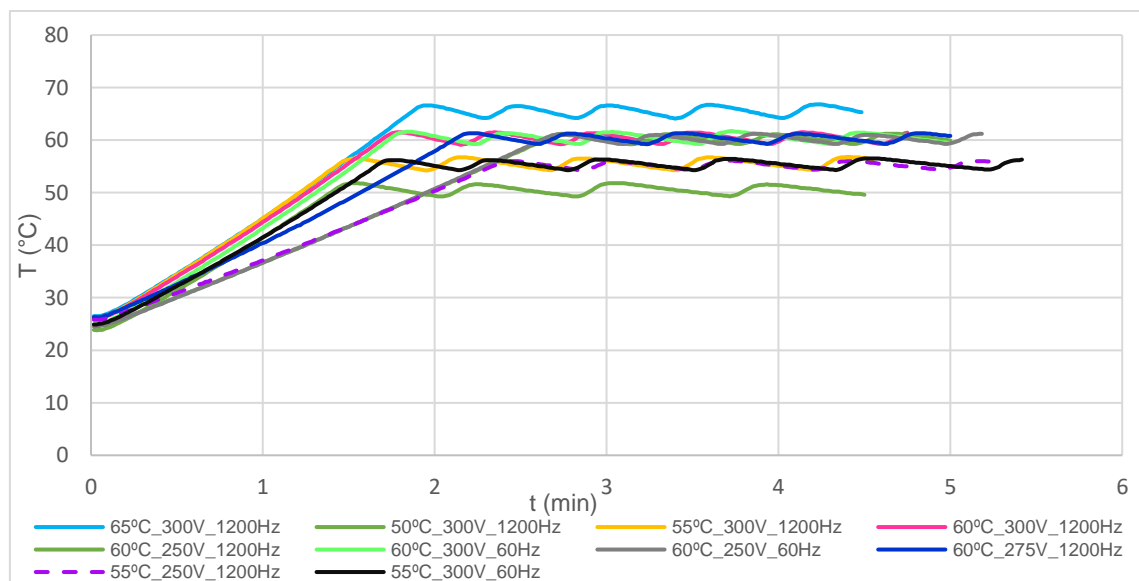
Con respecto a la frecuencia, en el agua no parecía haber relación entre la frecuencia y el tiempo de llegada a la T establecida. Por ejemplo, en los ensayos a 60°C y 300 V, a una frecuencia mayor (1200Hz) se precisan de 1,7 min para alcanzar la T establecida, asimismo, a una frecuencia menor (60 Hz) fue necesario un tiempo similar (1,73 min). Por otra parte, a 55°C, 300 V y 1200 Hz y a 55°C, 300 V y 60 Hz, se observa que los tiempos son de 1,43 y 1,67 min, respectivamente (Tabla 1). En este último caso, los valores difieren ligeramente debido a que la T inicial no es exactamente igual.

En el caso de la emulsión, los ensayos a 60°C y 300 V, muestran como a una frecuencia de 1200 Hz, el tiempo de llegada a la T establecida fue de 5,6 min, mientras que, para la frecuencia de 60 Hz, el tiempo fue de 5,12 min. Adicionalmente, a 60°C, 250 V y 1200 Hz el tiempo para alcanzar la T de llegada fue de 9,13 min mientras que a 60°C, 250 V y 60 Hz fue de 9,87 min (Tabla 1). Por tanto, no parece haber efecto de la frecuencia en los tiempos de calentamiento de la emulsión.

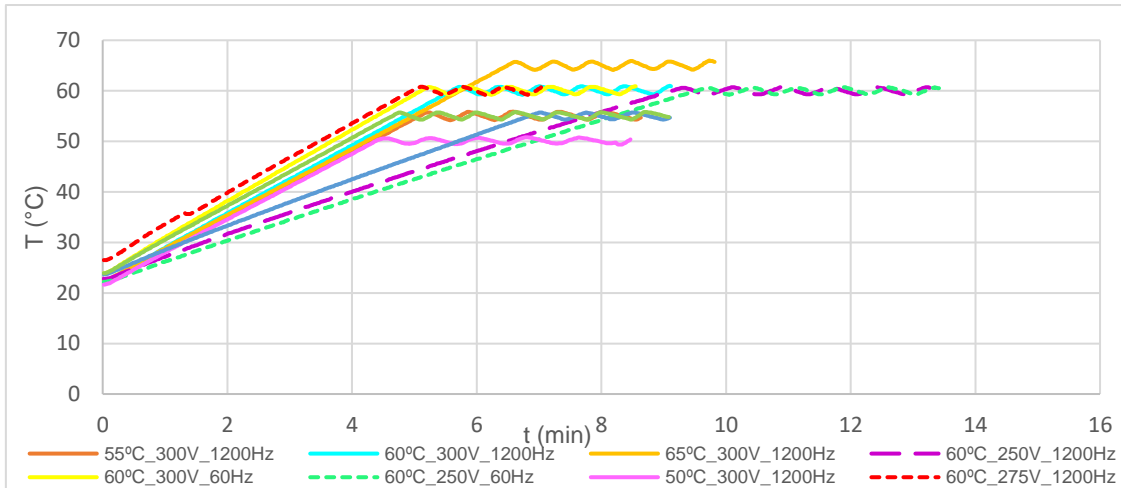
La conductividad eléctrica es la propiedad más importante que afecta al incremento de la temperatura en la tecnología MEF y depende en gran medida del contenido iónico del producto (Prósper, 2020; Silva et al., 2017). En este sentido, se observó como la conductividad eléctrica del medio influye notablemente en el paso de la corriente. Por un lado, la emulsión de agua en aceite al 20% (Intralipid 20%) al presentar una menor conductividad (0,37 mS/cm), precisaba de mayor tiempo para alcanzar la temperatura establecida en el sistema. Así pues, teniendo en cuenta todas las condiciones estudiadas, se tardaba de 4,37-9,87 min en alcanzar la temperatura establecida en la emulsión (Tabla 1, Figura 7). Por otra parte, dado que el agua presentaba un mayor valor de conductividad (1,02 mS/cm), en comparación a la emulsión de agua en aceite, el tiempo necesario para alcanzar la temperatura fijada se encontraba entre 1,4-2,63 min (Tabla 1, Figura 6).

**Tabla 1.** Valores de tiempo (min) para alcanzar la T establecida en las condiciones ensayadas en el equipo MEF para el agua y la emulsión.

	Agua	Emulsión
50°C, 300V, 1200Hz	1,4	4,37
55°C, 300V, 1200Hz	1,43	5,08
60°C, 300V, 1200Hz	1,7	5,6
65°C, 300V, 1200Hz	1,85	6,5
60°C, 275V, 1200Hz	2,12	4,97
60°C, 250V, 1200Hz	2,63	9,13
60°C, 300V, 60Hz	1,73	5,12
60°C, 250V, 60Hz	2,62	9,87
55°C, 250V, 1200Hz	2,33	6,83
55°C, 300V, 60Hz	1,67	4,65



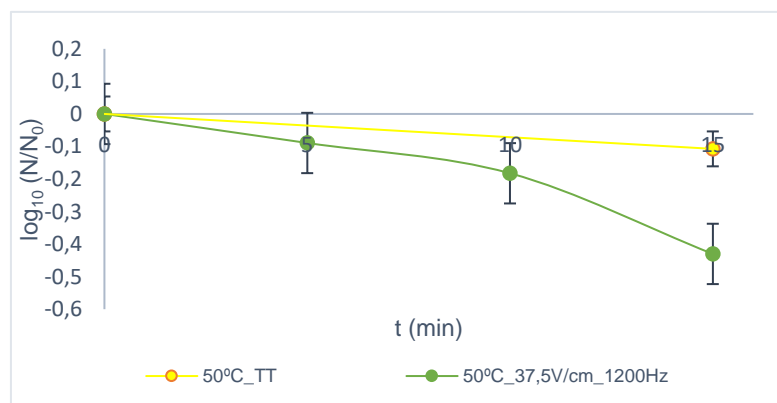
**Figura 6.** Perfiles de T vs t en agua para las 10 condiciones ensayadas mediante el equipo MEF.



**Figura 7.** Perfiles de T vs t en la emulsión Intralipid 20% en las 10 condiciones ensayadas mediante el equipo MEF.

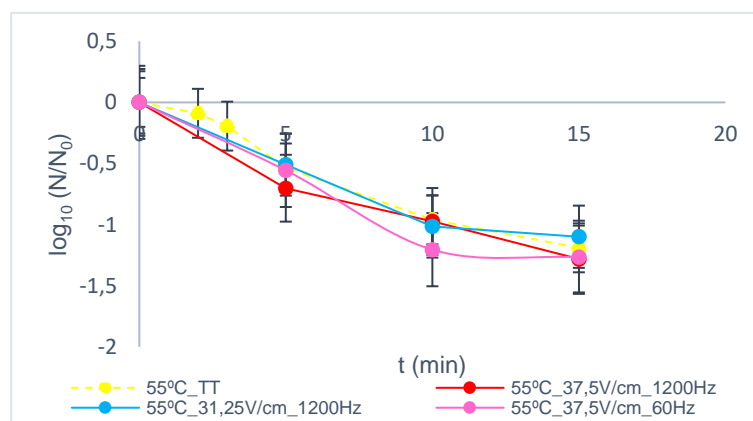
#### 4.2. Efecto de la aplicación de campos eléctricos moderados sobre la inactivación de *A.niger*

En este caso, se compararon los resultados de inactivación de los diferentes tratamientos térmicos con los correspondientes ensayos MEF que se realizaron a la misma temperatura. En la Figura 8 se muestra como a 50°C y 15 min, la inactivación de *A. niger* es significativamente superior ( $p < 0,05$ ) con el equipo MEF (a 37,5 V/cm y 1200 Hz), en comparación al tratamiento térmico convencional. Sin embargo, con el equipo MEF, en las condiciones indicadas en la Figura 8, la inactivación de *A.niger* es de únicamente 0,43 reducciones logarítmicas. Por tanto, el bajo valor de inactivación alcanzado a 15 min y 50°C indica que, a esa temperatura, el daño térmico sobre *A.niger* es muy reducido, por ello, deben utilizarse temperaturas más elevadas para tratamientos aplicables a nivel industrial. Por ejemplo, a 58, 60 y 62°C según Fujikawa e Itoh (1996), se observaban valores de inactivación mayores a 3 reducciones logarítmicas a los 15 min de tratamiento térmico.

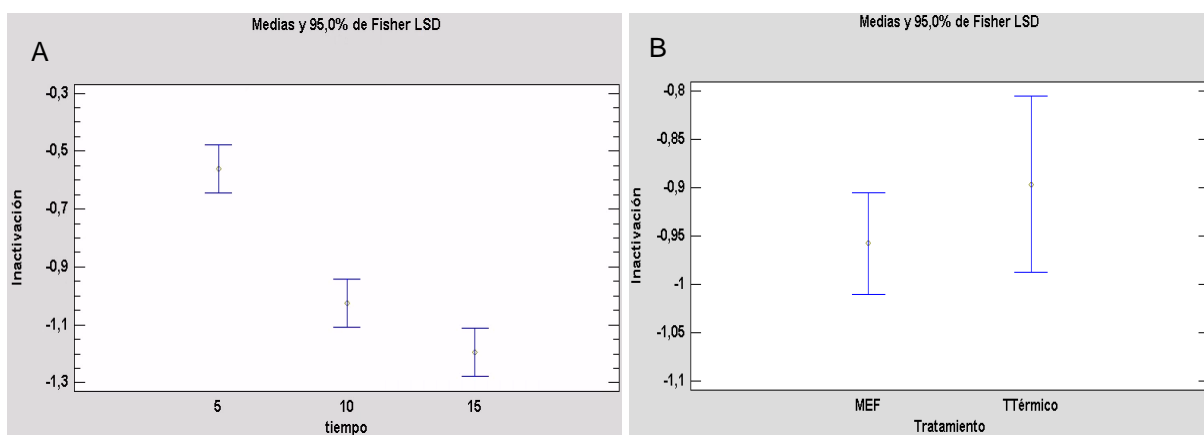


**Figura 8.** Comparación de tratamiento térmico (50°C\_TT) y ensayo de MEF a 50°C (50°C\_300V\_1200Hz o 50°C\_37,5V/cm\_1200Hz).

Por otro lado, en la Figura 9 se observa el efecto en la inactivación al realizar el tratamiento térmico a 55°C y los ensayos de MEF a esa T establecida. Con esa T y a 15 min se alcanzan valores de inactivación mayores (> a 1 ciclo log) que con la T de 50°C. La variabilidad en los recuentos mostrada en las Figuras 8 y 9 es debida a la variabilidad de los tratamientos (térmicos y de MEF), las siembras y los recuentos. Se realizó un análisis ANOVA y un test de comparación de medias (con intervalos LSD (95%)) para determinar si el tiempo de tratamiento y el uso de la tecnología MEF tiene un efecto significativo en la inactivación a esa temperatura. En este caso, el tiempo presenta un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en la inactivación, tal y como muestra la Figura 10 A, donde los intervalos LSD (utilizados para la comparación de medias) a los diferentes tiempos de tratamiento no se solapan. Por el contrario, la tecnología MEF no presentó un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre la inactivación a 55°C (Figura 10, B). Estos resultados reflejan, por un lado, que los niveles de inactivación a 55°C son bajos, y por otro lado, que no hay efecto del tratamiento MEF a esta temperatura en comparación con el tratamiento térmico convencional.



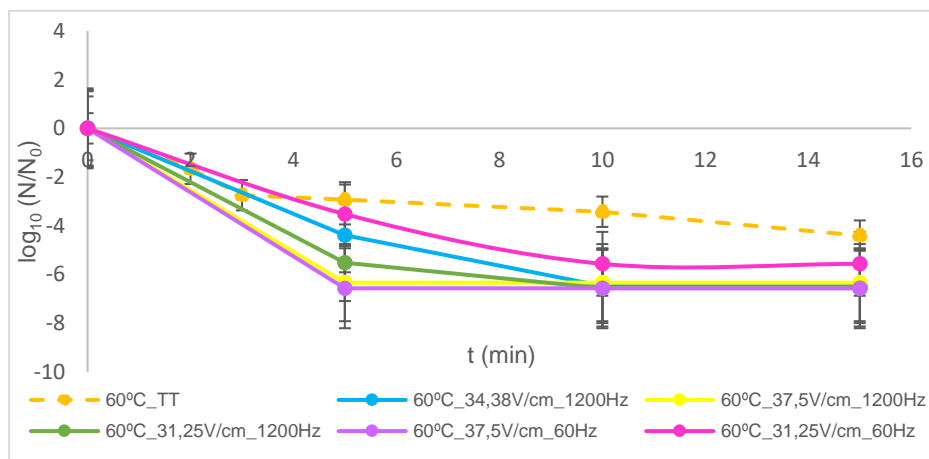
**Figura 9.** Comparación de tratamiento térmico (55°C\_TT) y ensayos de MEF a 55°C.



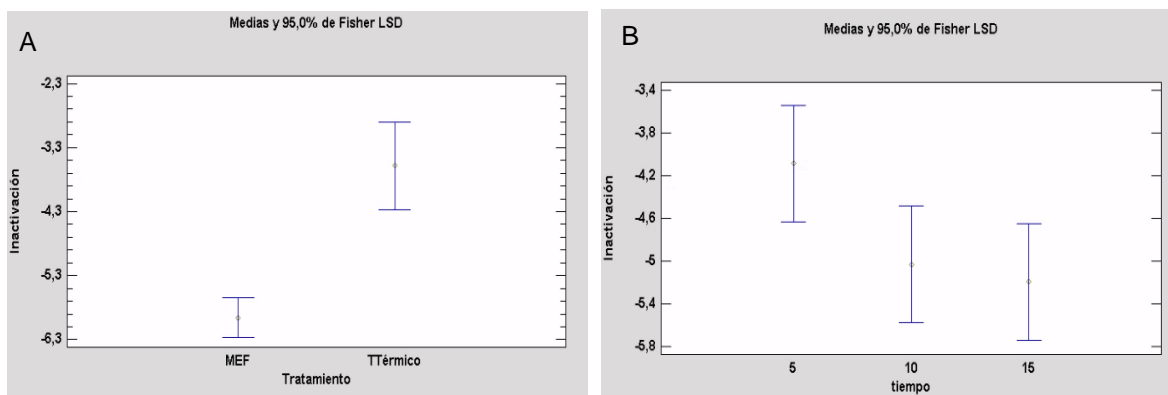
**Figura 10.** Gráficos de intervalos LSD (Least Significant Difference) (95%) para el factor tiempo (5, 10 y 15 min) (A) y para el factor Tipo de tratamiento (Tratamiento térmico y MEF) (B) a 55°C.

En el caso de los ensayos a 60°C (Figura 11), se observó la inactivación de todas las esporas de *A.niger* a los 5 min en las condiciones de 60°C y 37,5 V/cm a ambas frecuencias (60 y 1200 Hz) (>6 reducciones logarítmicas). Por otro lado, en las

condiciones de MEF con menor campo eléctrico (60°C, 34,38 V/cm y 1200 Hz; 60°C, 31,25 V/cm y 1200 Hz y 60°C, 31,25 V/cm y 60 Hz) se observó la inactivación de todos los microorganismos a partir de los 10 min de procesado (>5,5 reducciones logarítmicas). En cambio, en el tratamiento térmico a 60°C no se observaba inactivación de todas las esporas ni siquiera a los 15 min de procesado (4,4 reducciones logarítmicas). Al igual que en el caso anterior, se realizó un análisis ANOVA e intervalos LSD para determinar efectos significativos de los factores tiempo y tipo de tratamiento sobre la inactivación a 60°C. Según el análisis ANOVA, el tipo de tratamiento a esta temperatura sí resultó presentar un efecto significativo ( $p < 0,05$ , Figura 12A) sobre la inactivación de esporas de *A.niger*, por contra, el tiempo de tratamiento no presentó un efecto significativo ( $p > 0,05$ , Figura 12B). En este caso, los tiempos de tratamiento no resultaron significativos en la inactivación a 60°C, ya que como se comentó anteriormente a 10 y 15 min se producía ya la inactivación completa de las esporas en los ensayos MEF, donde se empleaban campos eléctricos de menor valor. Por otro lado, a 5 min, los valores de inactivación eran muy elevados para 34,38 y 31,25 V/cm y la inactivación completa en el caso de emplear 37,5 V/cm. Por este motivo, hubiese resultado de interés a esta temperatura, haber obtenido datos de los ensayos MEF a tiempos inferiores a 5 min (por ejemplo: 2, 2,5 y 3 min).

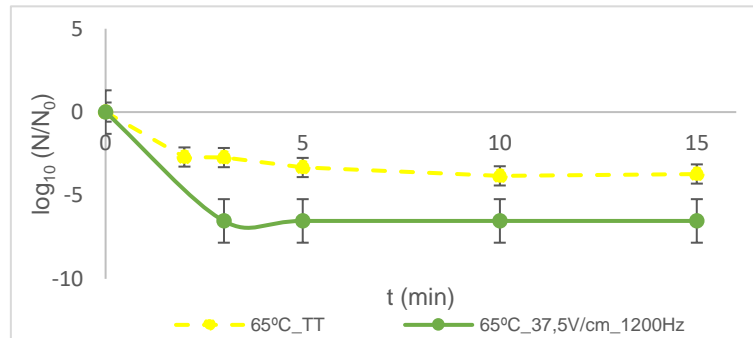


**Figura 11.** Comparación de tratamiento térmico (60°C\_TT) y ensayos de MEF a 60°C.

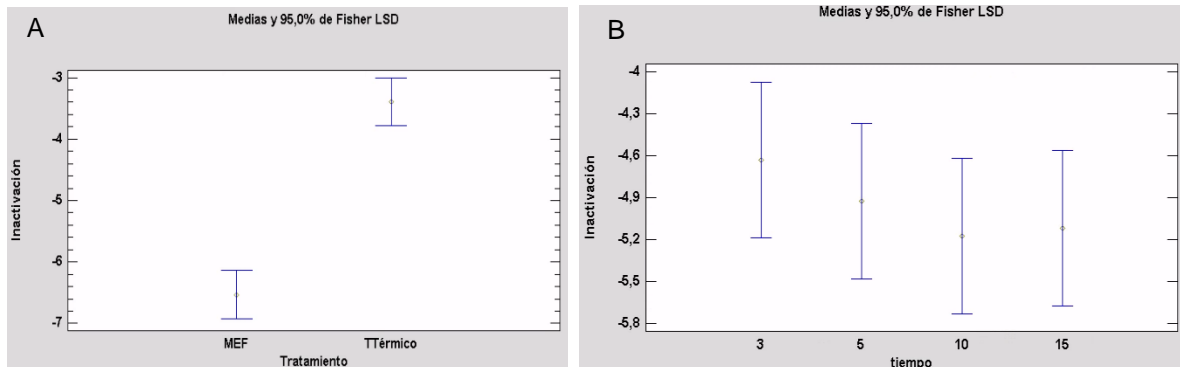


**Figura 12.** Gráficos de intervalos LSD (95%) para el factor Tipo de tratamiento (Tratamiento térmico y MEF) (A) y para el factor tiempo (5, 10 y 15 min) (B) a 60°C.

A la temperatura de 65°C (Figura 13) se mostró una mayor eficacia de la tecnología MEF a 37,5 V/cm y 1200 Hz, a los tiempos 3, 5, 10 y 15 min, ya que en esas condiciones *A.niger* fue inactivado completamente (>6 reducciones logarítmicas). Estos resultados están en la línea de los obtenidos a la temperatura de 60°C. Además, de manera similar a lo que ocurría a la T de 60°C, el análisis ANOVA demostró la existencia de un efecto significativo ( $p < 0,05$ , Figura 14A) del tipo de tratamiento utilizado. Sin embargo, a 65°C, el efecto del tiempo no fue significativo ( $p > 0,05$ ) sobre la inactivación de esporas de *A.niger*, encontrándose un solapamiento de los intervalos LSD a los tiempos de 3, 5, 10 y 15 min (Figura 14, B).



**Figura 13.** Comparación de tratamiento térmico (65°C\_TT) y ensayo de MEF a 65°C (65°C\_37,5V/cm\_1200Hz).



**Figura 14.** Gráficos de intervalos LSD (95%) para el factor Tipo de tratamiento (Tratamiento térmico y MEF) (A) y para el factor tiempo (3, 5, 10 y 15 min) (B) a 65°C.

Müller et al. (2021) estudiaron la inactivación de conidios de *Aspergillus fumigatus* con un tratamiento térmico convencional y con calentamiento óhmico en zumo de manzana. Se observaron efectos no térmicos durante el calentamiento óhmico con temperaturas de 75, 80 y 85°C. Además, el tiempo para conseguir la pasteurización del zumo, utilizando el calentamiento óhmico, redujo este parámetro en un 23 % en comparación al tratamiento convencional. Cabe destacar, que en el referido estudio, la frecuencia y el campo eléctrico se mantuvieron constantes, a 60 Hz y  $20 \pm 1$  V/cm, respectivamente.

Asimismo, Kim et al. (2017), trataron de inactivar esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (que contaminan jugos de manzana y son resistentes a los tratamientos térmicos convencionales) mediante calentamiento óhmico (OH). En este caso se empleó una intensidad de campo eléctrico de 26,7 V/cm (con un voltaje de 400 V) y una frecuencia de 25 kHz a temperaturas de 100°C durante 30 s. Así, el



calentamiento térmico convencional a esa temperatura y tiempo, resultó en una eficacia en la inactivación de *A.acidoterrestis* significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en comparación al calentamiento óhmico. Asimismo, el OH en las condiciones anteriores, no supuso cambios significativos en el pH o los grados Brix del zumo de manzana.

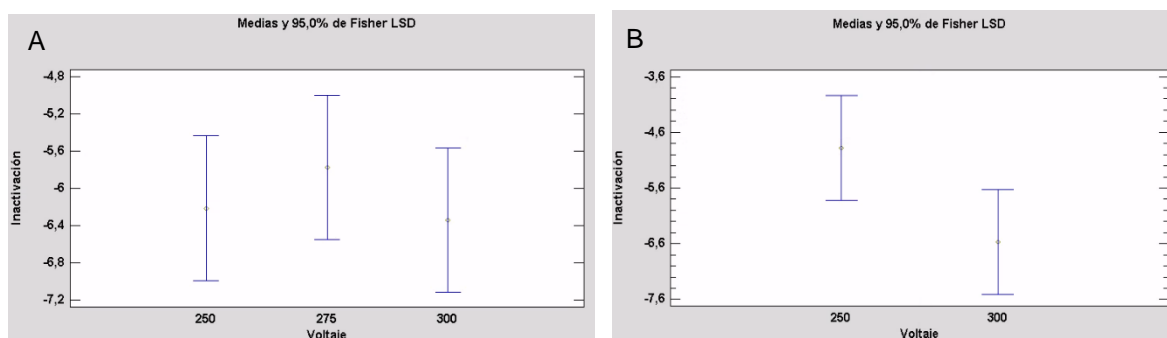
A pesar de que los estudios comentados anteriormente están relacionados con el calentamiento óhmico, se puede apreciar el efecto de la aplicación de un campo eléctrico moderado sobre la inactivación microbiana.

### 4.3. Efecto del voltaje en la inactivación de *A.niger*

El voltaje hace referencia a la tensión eléctrica, que es la medida de la capacidad para mover una carga eléctrica a través de un resistor y puede calcularse como la intensidad de corriente (I) por la resistencia que opone el material (R) ( $V = I * R$ ), esta es la primera ley de Ohm. Esta ley puede aplicarse tanto a circuitos de corriente continua (DC) como de corriente alterna (AC) (Silva et al., 2017).

Para evaluar el efecto de este parámetro en la inactivación por MEF se compararon ensayos que presentaban la misma temperatura y frecuencia y diferente voltaje. Adicionalmente, solo se tuvieron en cuenta los ensayos con una T establecida de 60°C (Figura 15), dado que a 55°C el efecto sobre la inactivación según el tipo de tratamiento (con la tecnología MEF o el tratamiento térmico convencional) no fue significativo ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 15 A, se estudia el efecto del voltaje (250, 275 y 300 V) a 60°C y 1200 Hz. Como se observa, los intervalos LSD se solapan para los voltajes estudiados, lo cual indica que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para este factor en la inactivación de esporas de *A.niger*. En el caso de la Figura 15 B (60°C y 60 Hz), también se muestra la inexistencia de un efecto de la tensión sobre la inactivación de *A.niger*. Probablemente, para poder evaluar si los valores de voltaje presentan un efecto significativo sobre la inactivación microbiana, deberían estudiarse otros valores más elevados (por ejemplo: 350, 400 y 450 V), lo cual no fue posible por el equipo disponible en el laboratorio.



**Figura 15.** Evaluación del efecto del voltaje en ensayos de MEF mediante intervalos LSD (95%). Comparación de ensayos a una T de 60°C y frecuencia de 1200 Hz con voltajes de 300 V, 275 V y 250 V (A). Comparación de ensayos a una T de 60°C y frecuencia de 60 Hz con voltajes de 300 V y 250 V (B).

Machado et al. (2010) utilizaron campos eléctricos moderados con T inferiores a 25°C para la inactivación de *E.coli*. Así, la inactivación no se debería a un efecto sinérgico entre la aplicación de campos eléctricos y la temperatura. En concreto, el medio tratado fue un buffer fosfato diluido con agua ultrapura. En el estudio concluyeron que los campos eléctricos por encima de 220 V/cm producían reducciones de 3 ciclos logarítmicos de *E.coli* en un tiempo inferior a 6 min. Por último, es conveniente indicar que estos autores analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) si las células de *E.coli* se veían afectadas tras la exposición a los MEF, observando cambios en la membrana celular, los cuales podían ser la causa de la muerte celular.

En el caso de este estudio, se utiliza un campo eléctrico mayor en comparación a los aquí estudiados (37,5, 34,38 y 31,25 V/cm), esto es debido a que se utilizó una T ambiente (25°C) para evitar efectos térmicos indeseables. Sin embargo, el empleo de una T moderada de 60°C, no implica que se produzcan efectos térmicos indeseables sobre el medio tratado. El objetivo de la T es que exista un efecto sinérgico junto con el campo eléctrico aplicado, de manera que permita la reducción del tiempo para la inactivación de esporas de *A.niger*.

Mok et al. (2019), probaron la efectividad de la combinación de esfuerzos cortantes rotacionales (SS) y de MEF para la inactivación de *E.coli* K12 en zumo de manzana a dos temperaturas (40 y 50°C), hasta un tiempo de 30 min. Los valores seleccionados de esfuerzos cortantes fueron de 151,5-2879 s<sup>-1</sup> y para la intensidad de campo eléctrico de 0-120 V/cm. La reducción bacteriana de esta combinación (SS+MEF) resultó significativamente mayor (p<0,05) en comparación al tratamiento térmico convencional a la misma temperatura y a los tratamientos SS y MEF por separado.

Se vio como a medida que se aumentaba el parámetro SS (151,5, 454,6, 1666,8 y 2879 s<sup>-1</sup>), la intensidad de campo eléctrico (0, 20, 60 y 120 V/cm) y la temperatura (40 y 50°C) se producía una mayor tasa de inactivación microbiana.

La mayor tasa de muerte se alcanzó a los 7,5 min con 5,62 ± 0,44 reducciones logarítmicas con la combinación de la velocidad de corte de 2879 s<sup>-1</sup> y una intensidad de campo eléctrico de 120 V/cm a 50°C. Además, en este caso, no hubo cambios significativos sobre el pH, color o la actividad antioxidante en el zumo de manzana.

Murashita et al. (2017) evaluaron los efectos de la intensidad de campo eléctrico en la inactivación por calentamiento óhmico de esporas de *Bacillus subtilis*. Estos autores concluyeron que a medida que se aumentaba la intensidad de campo eléctrico (5, 10 y 20 V/cm) y la frecuencia, se aumentaba la inactivación de esporas de *B.subtillis*. Para ello, utilizaron una temperatura de 101°C y un medio acuoso de cloruro sódico que fue inoculado con esporas *B.subtillis*. En concreto, a 20 V/cm la inactivación fue significativamente mayor (p<0,05) en comparación al tratamiento térmico convencional a 8, 10, 12, 14 y 16 min.

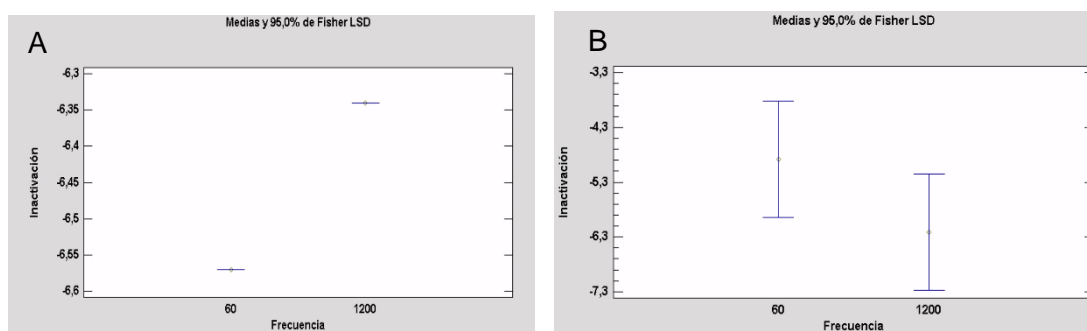
En vista de los resultados obtenidos por varios autores, aunque no se haya encontrado bibliografía relacionada con el efecto del campo eléctrico en la inactivación de hongos, se observa que a medida que aumenta la intensidad de campo eléctrico (V/cm), y por ende si se aumenta el voltaje, se produce mayor inactivación microbiana. Por todo ello, se sugiere el empleo de voltajes mayores que los empleados en el presente TFG. A su vez, otra medida podría ser la reducción entre la distancia de los electrodos en la cámara de tratamiento de MEF, aumentando así el valor de la intensidad de campo eléctrico.

#### 4.4. Efecto de la frecuencia en la inactivación de *A.niger*

La frecuencia y la forma de onda según el voltaje aplicado puede afectar a la eficiencia y la calidad del procesado por MEF. Además, se sabe que pueden tener lugar reacciones electroquímicas indeseables (electrolisis) entre la superficie de los electrodos y el medio con el que están en contacto. Esto último sobre todo ocurre cuando se hace uso de frecuencias bajas (Silva et al., 2017).

Para determinar el efecto de este factor se hizo uso de experiencias a la misma temperatura y voltaje, aunque con diferentes frecuencias. Únicamente se emplearon los ensayos a 60°C y un voltaje de 250 V para evaluar cómo afecta este parámetro en la inactivación. Esto se debe a que los ensayos a 55°C y 300 V no mostraron efectos significativos de inactivación microbiana al emplear la tecnología de MEF ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, el análisis ANOVA no fue concluyente para los ensayos a 60°C y 300 V, dado que no existía variabilidad en los datos y no se obtuvo un valor  $p$  a través del programa Statgraphics Centurion (Figura 16A).

En este contexto, en la Figura 16 B se ilustra que no existe un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) de la frecuencia sobre la inactivación de esporas de *A.niger*.



**Figura 16.** Evaluación del efecto de la frecuencia en ensayos de MEF mediante intervalos LSD (95%). Comparación de ensayos a una T de 60°C y voltaje de 300 V con frecuencias de 60 Hz y 1200 Hz (A). Comparación de ensayos a una T de 60°C y voltaje de 250 V con frecuencias de 60 Hz y 1200 Hz (B).

No se ha encontrado bibliografía al respecto del efecto de la frecuencia en esporas de hongos. Sin embargo, sí se han estudiado casos del efecto de este parámetro sobre esporas en diferentes especies bacterianas. Debe tenerse en cuenta que las esporas bacterianas son, por lo general, más resistentes que las de hongos. Sin embargo, se comentarán los resultados de algunos estudios que relacionan el efecto de la frecuencia con la inactivación de esporas bacterianas.

Murashita et al. (2017) determinaron los efectos de la frecuencia en la inactivación por calentamiento óhmico de esporas de *Bacillus subtilis*. Con este objetivo, concluyeron que, a medida que se aumentaba la frecuencia (20, 40 y 60 kHz) y la intensidad de campo eléctrico (hasta 20 V/cm) se aumentaba la inactivación de esporas de *B.subtilis*. Para ello, utilizaron una temperatura de 101°C y un medio acuoso de cloruro sódico que fue inoculado con esporas de la bacteria en cuestión. En concreto, se produjo la

inactivación completa de esporas a 60 kHz de los 14 a los 16 min, sin embargo, a esos tiempos las esporas todavía permanecían vivas en los tratamientos de 20 y 40 kHz.

Somavat et al. (2012) trataron de inactivar esporas de *Geobacillus stearothermophilus* por calentamiento óhmico y compararon la efectividad con el tratamiento térmico convencional. Para este estudio los tratamientos óhmicos se llevaron a cabo a frecuencias de 60 y 10 kHz a temperaturas de 121, 125 y 130°C.

La frecuencia de 10 kHz presentaba una tendencia general de mayor inactivación que el tratamiento convencional a las tres temperaturas. Por otro lado, el tratamiento óhmico de 60 Hz mostró un patrón de inactivación mejorado en comparación con el tratamiento convencional a medida que se aumentaba la temperatura del proceso. Así, a la temperatura de 121°C, el valor *D* (El valor *D* hace referencia al tiempo necesario a una temperatura dada, para reducir la población microbiana en 1 ciclo logarítmico) fue significativamente inferior (de 0,88 min) para el calentamiento óhmico a 10 kHz en comparación a los valores *D* para el OH a 60 Hz (1,17 min) y el tratamiento térmico convencional (2,53 min). A 125°C los OH a ambas frecuencias (10 kHz y 60 Hz) mostraron valores *D* significativamente inferiores (0,43 y 0,34 min, respectivamente) al tratamiento térmico convencional, el cual presentó un valor *D* igual a 0,64 min. En cambio, a 130°C los OH a 10 kHz y 60 Hz mostraron valores *D* de 0,05 min en ambos casos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ) respecto al tratamiento térmico convencional (con valor *D* 0,06 min).

Cabe destacar que estos autores (Somavat et al., 2012) no reflejan datos concretos de voltaje o de intensidad de campo eléctrico.

Estos resultados sugieren que el empleo de frecuencias mayores a 1200 Hz (que del mismo modo evitan el fenómeno de electrolisis en los electrodos) en el caso de esporas del hongo *A.niger*, podría mejorar los resultados de inactivación. Asimismo, debe considerarse el planteamiento anteriormente explicado sobre la menor resistencia de las esporas de hongos frente a las de bacterias.

## 5. CONCLUSIONES

El calentamiento de los medios (agua y emulsión) en el equipo de MEF, se realiza con el objetivo de evaluar voltajes y frecuencias que son viables en cuanto a tiempo de procesado, para alcanzar la T establecida con un sistema de MEF. Así pues, se pone de manifiesto cómo un medio con mayor valor de conductividad eléctrica, presenta un menor tiempo para alcanzar la T establecida (en el agua se alcanza la T establecida entre 1-3 min y en la emulsión entre 4-10 min). Además, el aumento en el voltaje reduce el tiempo de llegada a la T establecida, en cambio, la modificación de la frecuencia no permite la disminución del tiempo de llegada a T establecida.

El trabajo realizado muestra cómo el empleo de la tecnología de campos eléctricos moderados (MEF) para la inactivación de esporas de *A.niger* en una emulsión de aceite en agua, muestra resultados significativamente ( $p < 0,05$ ) mejores a los tratamientos térmicos convencionales, si se emplean temperaturas iguales o superiores a 60°C. Por ello, el efecto sinérgico entre el empleo de MEF y temperaturas moderadas, supone una

tecnología prometedora para la inactivación microbiana en medios de uso alimentario, médico o farmacéutico. Con este propósito, deben realizarse más estudios con otro tipo de microorganismos (que puedan suponer un peligro frente a la seguridad y calidad en estos productos) en el mismo medio y otros distintos, para evaluar el efecto de esta tecnología.

Por otro lado, el voltaje y la frecuencia no han resultado significativos ( $p > 0,05$ ) en la inactivación de esporas de *A.niger* en una emulsión, para las condiciones ensayadas en el trabajo. Probablemente, el estudio de tiempos inferiores a 5 min con temperaturas comprendidas entre 58 a 62°C y haciendo uso de la tecnología MEF, podría dar resultados respecto al efecto de estos dos parámetros. Adicionalmente, varios estudios señalan que un aumento en el campo eléctrico aplicado (V/cm) produce mayor inactivación microbiana. Así, resultaría de interés el empleo de voltajes (V) mayores a los estudiados, evaluando así, los efectos sobre la inactivación en este tipo de medio y para las esporas de *A.niger*.

Cabe destacar que varios estudios indican que los MEF, junto con temperaturas moderadas, evitan la pérdida de compuestos de interés en los medios tratados, que sí ocurre frecuentemente con los tratamientos térmicos convencionales. No obstante, este aspecto no se ha abordado en el presente proyecto, dado que no se ha estudiado el efecto de los MEF y las temperaturas moderadas sobre los cambios físico-químicos que pueden producirse en el medio (pH, color, etc.) o en ciertos componentes de interés (lípidos, proteínas, etc.), representando un área de estudio para el futuro.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AADIL, R. M.; ZENG, X.; ALI, A.; ZENG, F.; FAROOQ, M. A. & HAN, Z. (2015). Influence of different pulsed electric field strengths on the quality of the grapefruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 2290–2296.
- ABEE, T. & WOUTERS, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 65–91.
- AĞÇAM, E.; AKYILDIZ, A. & DÜNDAR, B. (2018). Thermal pasteurization and microbial inactivation of fruit juices, en: *Fruit juices*. Academic Press. Cambridge: 309–339.
- AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS). *Prospecto intralipid 200 mg/ml emulsion para perfusion*. <[https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/43165/Prospecto\\_43165.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/43165/Prospecto_43165.html)> [Consulta: 18 de julio de 2021]
- AMARAL, G. V.; SILVA, E. K.; CAVALCANTI, R. N.; CAPPATO, L. P.; GUIMARAES, J. T.; ALVARENGA, V. O.; ... & CRUZ, A. G. (2017). Dairy processing using supercritical carbon dioxide technology: Theoretical fundamentals , quality and safety aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 94–101.
- AUGUSTO, P. E. D.; SOARES, B. M. C. & CASTANHA, N. (2018). Conventional

- technologies of food preservation, en: *Innovative technologies for food preservation*. Academic Press. Cambridge: 3-23.
- BARBA, F. J.; AHRNE, L. & XANTHAKIS, E. (2018). Innovative Technologies for Food Preservation, en: *Innovative Technologies for Food Preservation*. Academic Press. Cambridge: 25–51.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. & ALTUNAKAR, B. (2006). Pulsed electric fields processing of foods: an overview, en: *Pulsed electric fields technology for the food industry*. Springer. Berlín: 3–26.
- BULUT, S. & KARATZAS, K. A. G. (2021). Inactivation of Escherichia coli K12 in phosphate buffer saline and orange juice by high hydrostatic pressure processing combined with freezing. *LWT- Food Science and Technology*, 136, 110313.
- CEBRIÁN, G.; CONDÓN, S. & MAÑAS, P. (2017). Physiology of the Inactivation of Vegetative Bacteria by Thermal Treatments: Mode of Action, Influence of Environmental Factors and Inactivation Kinetics. *Foods*, 6(12), 107.
- CENI, G.; SILVA, M. F.; VALÉRIO JR, C.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; ROSA, C. D. & MAZUTTI, M. A. (2016). Continuous inactivation of alkaline phosphatase and Escherichia coli in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 13, 24–28.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Foodborne Germs and Illnesses*. <<https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>> [Consulta: 20 de mayo de 2021]
- CK-12 FOUNDATION (CK-12). *Fungi Structure*. <<https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-biology-flexbook-2.0/section/8.9/primary/lesson/fungi-structure-bio>> [Consulta: 25 de julio de 2021]
- DELGADO, M.; ESCAMILLA, L.; PÉREZ, A. & ARIAS, J. (2004). Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Universitas Scientiarum*, 9(2), 23–33.
- DELORME, M. M.; GUIMARÃES, J. T.; COUTINHO, N. M.; BALTHAZAR, C. F.; ROCHA, R. S.; SILVA, R.; MARGALHO, L. P.; ... & 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.
- DEMAIN, A. L. & MARTENS, E. (2017). Production of valuable compounds by molds and yeasts. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 347–360.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). *Foodborne diseases*. <<https://www.ecdc.europa.eu/en/climate-change/climate-change-europe/food-borne-diseases>> [Consulta: 21 de mayo de 2021]
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Most common foodborne illnesses*.

<<https://www.fda.gov/files/food/published/Most-Common-Foodborne-Illnesses-%28PDF%29.pdf>> [Consulta: 27 de mayo de 2021]

- FUJIKAWA, H. & ITOH, T. (1996). Tailing of thermal inactivation curve of *Aspergillus niger* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3745–3749.
- GALLO, M.; FERRARA, L. & NAVIGLIO, D. (2018). Application of Ultrasound in Food Science and Technology : A Perspective. *Foods*, 7(10), 164.
- GAVAHIAN, M.; CHU, Y. H. & SASTRY, S. (2018). Extraction from Food and Natural Products by Moderate Electric Field: Mechanisms, Benefits, and Potential Industrial Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 1040–1052.
- GAVAHIAN, M. & TIWARI, B. K. (2020). Moderate electric fields and ohmic heating as promising fermentation tools. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 64, 102422.
- GOMEZ-GOMEZ, A.; BRITO, E.; GALLEGOS, C.; GARCIA-PEREZ, J. V. & BENEDITO, J. (2021). Combination of supercritical CO<sub>2</sub> and high-power ultrasound for the inactivation of fungal and bacterial spores in lipid emulsions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105636.
- GREGORY, P. J.; INGRAM, J. S. I. & BRKLACICH, M. (2005). Climate change and food security. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1463), 2139–2148.
- GUERRERO-BELTRÁN, J. A. & BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. (2004). Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light. *Food Science and Technology International*, 10(3), 137–147.
- HEARTLAND VETERINARY SUPPLY AND PHARMACY (HVSP). *Intralipid 20% IV Fat Emulsion*.<<https://www.heartlandvetsupply.com/p-5694-intralipid-20-iv-fat-emulsion.aspx>> [Consulta:18 de julio de 2021]
- HOFFMANN, S. & SCALLAN, E. (2017). Epidemiology, Cost, and Risk Analysis of Foodborne Disease, en: *Foodborne Diseases*, 3ªEd. Academic Press. Cambridge: 31–63.
- HOJNIK, N.; MODIC, M.; NI, Y.; FILIPIC, G.; CVELBAR, U. & WALSH, J. L. (2019). Effective Fungal Spore Inactivation with an Environmentally Friendly Approach Based on Atmospheric Pressure Air Plasma. *Environmental Science & Technology*, 53, 1893–1904.
- HUANG, H. W.; HSU, C. P. & WANG, C. Y. (2020). Healthy expectations of high hydrostatic pressure treatment in food processing industry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(1), 1–13.
- HUISMAN, G. W.; SIEGELE, D. A.; ZAMBRANO, M. M. & KOLTER, R. (1996). Morphological and Physiological Changes During Stationary Phase, en:

*Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2<sup>a</sup> Ed. ASM Press. Washington, DC: 1672–1682).

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO (INSST).  
*Aspergillus spp.* <<https://acortar.link/M89EzB>> [Consulta: 22 de agosto de 2021]

JADHAV, H. B.; ANNAPURE, U. S. & DESHMUKH, R. R. (2021). Non-thermal Technologies for Food Processing. *Frontiers in Nutrition*, 8, 1–14.

KAUR, N. & SINGH, A. K. (2016). Ohmic Heating : Concept and Applications — A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2338–2351.

KIM, Y. S.; PARK, K. H.; CHUN, H. S.; CHOI, C. & BAHK, G. J. (2015). Correlations between climatic conditions and foodborne disease. *Food Research International*, 68, 24–30.

KIM, N. H.; RYANG, J. H.; LEE, B. S.; KIM, C. T. & RHEE, M. S. (2017). Continuous ohmic heating of commercially processed apple juice using five sequential electric fields results in rapid inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *International journal of food microbiology*, 246, 80-84.

KNORR, D. & AUGUSTIN, M. A. (2021). Food processing needs, advantages and misconceptions. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 103–110.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G. J.; WANG, F.; MÜLLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, J. & WÖSTEN, H. A. B. (2013). Development in aspergillus. *Studies in Mycology*, 74, 1–29.

LADO, B. H. & YOUSEF, A. E. (2003). Selection and Identification of a *Listeria monocytogenes* Target Strain for Pulsed Electric Field Process Optimization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2223–2229.

LAVILLA, M. & GAYÁN, E. (2018). Consumer acceptance and marketing of foods processed through emerging technologies, en: *Innovative technologies for food preservation*. Academic Press. Cambridge: 233–253.

LÓPEZ-MALO, A. & PALOU, E. (2005). Ultraviolet Light and Food Preservation, en: *Novel food processing technologies*, 1<sup>a</sup> Ed. CRC Press. Florida: 405–421.

MACHADO, L. F., PEREIRA, R. N., MARTINS, R. C., TEIXEIRA, J. A. & VICENTE, A. A. (2010). Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *Journal of food engineering*, 96(4), 520-527.

MACKEY, B. (2000). Injured bacteria. *The Microbiological Safety, and Quality of Food*, 1, 315–341.

MAÑAS, P. & PAGÁN, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1387–1399.

MILES, C. A. (2006). Relating cell killing to inactivation of critical components. *Applied*



and *Environmental Microbiology*, 72(1), 914–917.

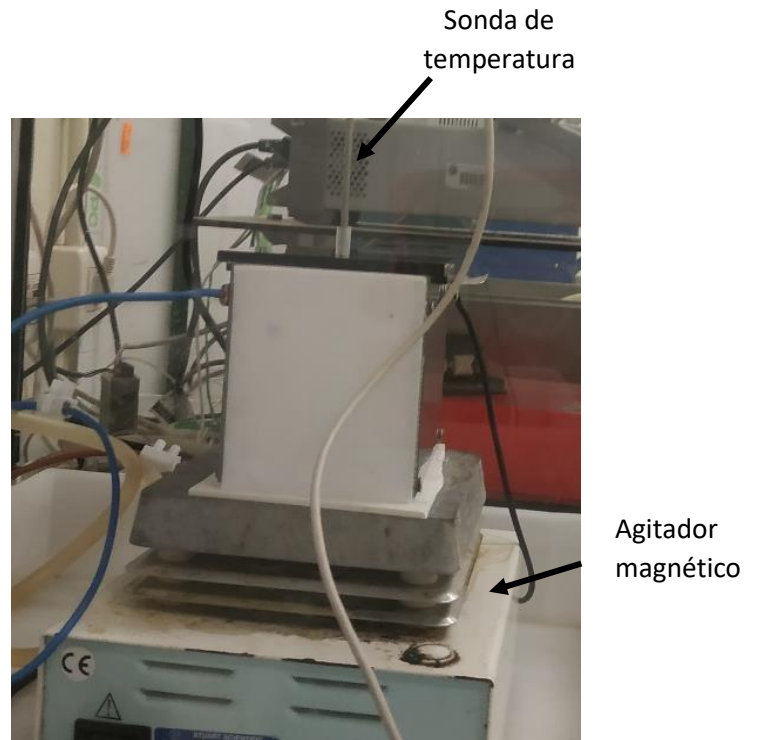
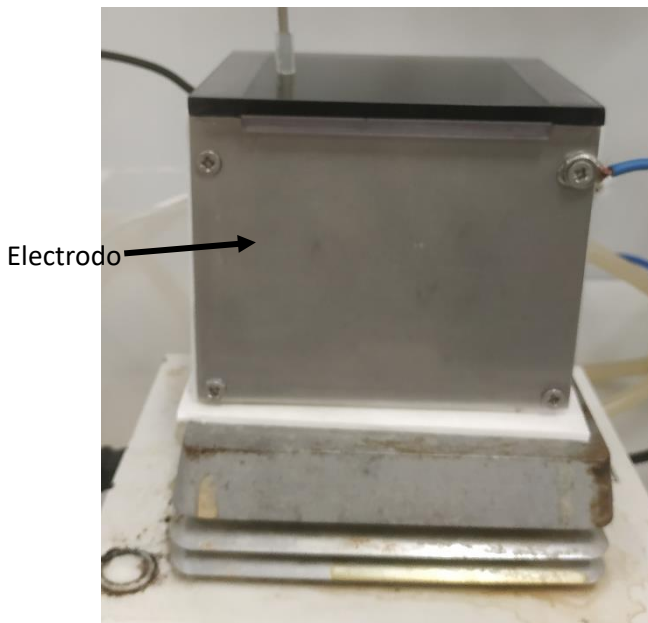
- MISRA, N. N.; YADAV, B.; ROOPESH, M. S. & JO, C. (2019). Cold Plasma for Effective Fungal and Mycotoxin Control in Foods: Mechanisms, Inactivation Effects, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 106-120.
- MOK, J. H.; PYATKOVSKYY, T.; YOUSEF, A. & SASTRY, S. K. (2019). Combined effect of shear stress and moderate electric field on the inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice. *Journal of Food Engineering*, 262, 121–130.
- MÜLLER, W. A.; DAMASCENO, L.; MARCZAK, F. & SARKIS, J. R. (2020). Microbial inactivation by ohmic heating : Literature review and influence of different process variables. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 650–659.
- MÜLLER, W. A.; PASIN, M. V. A.; SARKIS, J. R. & MARCZAK, L. D. F. (2021). Effect of pasteurization on *Aspergillus fumigatus* in apple juice: Analysis of the thermal and electric effects. *International Journal of Food Microbiology*, 338, 108993.
- MURASHITA, S.; KAWAMURA, S. & KOSEKI, S. (2017). Effects of ohmic heating, including electric field intensity and frequency, on thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of food protection*, 80(1), 164-168.
- NIAKOUSARI, M.; GAHRUIE, H. H.; RAZMJOOEI, M.; ROOHINEJAD, S. & GREINER, R. (2018). Effects of innovative processing technologies on microbial targets based on food categories: Comparing traditional and emerging technologies for food preservation, en: *Innovative technologies for food preservation*. Academic Press. Cambridge: 133-185.
- NIVEN, G. W.; MILES, C. A. & MACKEY, B. M. (1999). The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: An in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*, 145(2), 419–425.
- NUNES, L. & TAVARES, G. M. (2019). Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 88–99.
- O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K.; BOURKE, P. & CULLEN, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358–367.
- ODEYEMI, O. A. (2016). Public health implications of microbial food safety and foodborne diseases in developing countries. *Food & Nutrition Research*, 60.
- OEY, I.; VAN DER PLANCKEN, I.; VAN LOEY, A. & HENDRICKX, M. (2008). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems ?. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 300–308.
- PANKAJ, S. K. & KEENER, K. M. (2017). Cold plasma : background , applications and current trends. *Current Opinion in Food Science*, 16, 49–52.

- PANKAJ, S. K.; WAN, Z. & KEENER, K. M. (2018). Effects of Cold Plasma on Food Quality : A Review. *Foods*, 7(1), 4.
- PARK, M. S.; PARK, K. H. & BAHK, G. J. (2018). Combined influence of multiple climatic factors on the incidence of bacterial foodborne diseases. *Science of the Total Environment*, 610, 10–16.
- PARTSCH, G.; DRAXLER, H. & ALTMANN, H. (1969). The ultra-structure of spores of *Byssochlamys fulva*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 39(3), 305–313.
- PATIST, A. & BATES, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry : From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 147–154.
- PORTNOY, J. M. & JARA, D. (2015). Mold allergy revisited. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 114(2), 83–89.
- PRÓSPER, J. (2020). *Intensificación de procesos de inactivación microbiana y enzimática en el sector agroalimentario mediante aplicación de campos eléctricos moderados*. Trabajo Final de Máster. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- RASO, J.; CALDERÓN, M. L.; GÓNGORA, M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. & SWANSON, B. G. (1998). Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 31(7–8), 668–672.
- ROOHINEJAD, S.; KOUBAA, M.; SANT'ANA, A. S. & GREINER, R. (2018). Mechanisms of microbial inactivation by emerging technologies, en: *Innovative technologies for food preservation*. Academic Press. Cambridge: 111–132.
- SALE, A. J. H. & HAMILTON, W. A. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 148(3), 781–788.
- SANGO, D. M.; ABELA, D.; MCELHATTON, A. & VALDRAMIDIS, V. P. (2014). Assisted ultrasound applications for the production of safe foods. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1067–1083.
- SASTRY, S. (2008). Ohmic heating and moderate electric field processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 419–422.
- SHARIF, M. K.; JAVED, K. & NASIR, A. (2018). Foodborne Illness: Threats and Control, en: *Foodborne Diseases*. Academic Press. Cambridge: 501-523.
- SHIN, J. Y.; KIM, S. J.; KIM, D. K. & KANG, D. H. (2016). Fundamental Characteristics of Deep-UV Light-Emitting Diodes and Their Application To Control Foodborne Pathogens Joo-Yeon. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 2–10.
- SILVA, E. K. & MEIRELES, M. A. A. (2014). Encapsulation of Food Compounds Using

- Supercritical Technologies: applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. *Food and Public Health* 2014, 4(5), 247–258.
- SILVA, V. L.; SANTOS, L. M. & SILVA, A. M. (2017). Ohmic heating: An emerging concept in organic synthesis. *Chemistry–A European Journal*, 23(33), 7853-7865.
- SMELT, J. P. P. M. & BRUL, S. (2014). Thermal Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(10), 1371–1385.
- SOMAVAT, R.; MOHAMED, H. M.; CHUNG, Y. K.; YOUSEF, A. E. & SASTRY, S. K. (2012). Accelerated inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by ohmic heating. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 69-76.
- THIRUMDAS, R.; SARANGAPANI, C. & ANNAPURE, U. S. (2015). Cold Plasma : A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*, 10(1), 1–11.
- TOEPFL, S.; SIEMER, C.; SALDAÑA-NAVARRO, G. & HEINZ, V. (2014). Overview of Pulsed Electric Fields Processing for Food, en: *Emerging technologies for food processing*. Academic Press. Cambridge: 93–114.
- TSONG, T. Y. (1990). On electroporation of cell membranes and some related phenomena. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 299(3), 271–295.
- WANG, C.; HUANG, H.; HSU, C. & YANG, B. B. (2015). Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 527-540.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Foodborne diseases*. <[https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1)> [Consulta: 20 de mayo de 2021]
- WOUTERS, P. C.; ALVAREZ, I. & RASO, J. (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 112–121.
- WU, D.; FORGHANI, F.; DALIRI, E. B.; LI, J.; LIAO, X.; LIU, D.; ... & DING, T. (2020). Trends in Food Science & Technology Microbial response to some nonthermal physical technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 107–117.
- ZHANG, Z. H.; WANG, L. H.; ZENG, X. A.; HAN, Z. & BRENNAN, C. S. (2019). Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), 1–13.
- ZIMMERMANN, U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 105, 176–256.

## ANEXOS

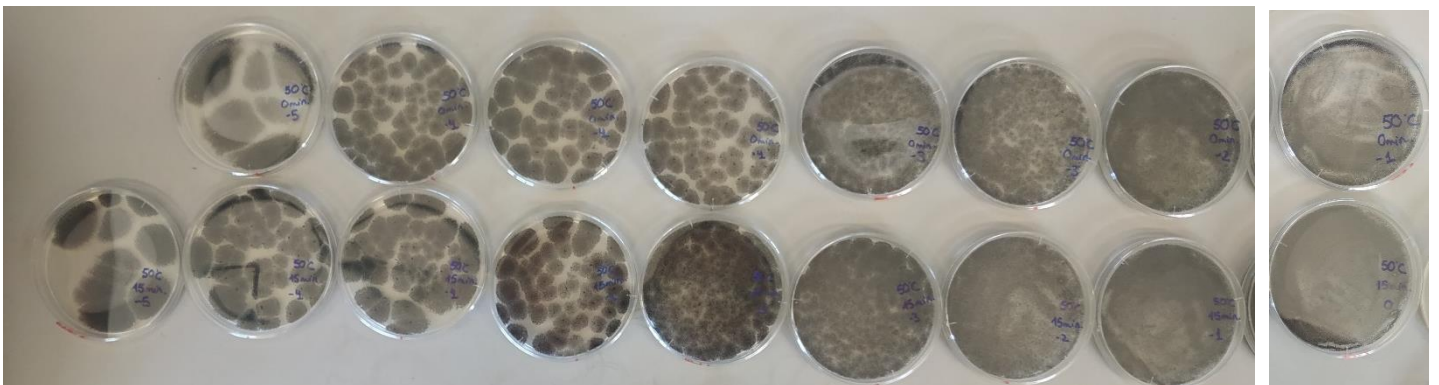
### I. Celda de tratamiento MEF



### II. Ejemplo de resultados de un tratamiento térmico.

En la imagen, de derecha a izquierda se muestran las diluciones en el orden:  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ .

Temperatura:  $50^{\circ}\text{C}$ .



Fila 1  $\rightarrow$   $t = 0$  min (corresponde a la población inicial). Dilución  $10^{-4}$  sembrada por triplicado. Dilución  $10^{-3}$  sembrada por duplicado. Las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  se siembran una sola vez.

Fila 2  $\rightarrow$   $t = 15$  min Dilución  $10^{-4}$  sembrada por triplicado. Dilución  $10^{-3}$  sembrada por duplicado. Las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  se siembran una sola vez.

### III.I. Diluciones sembradas por triplicado en tratamientos térmicos

		t = 0 min	t = 2 min	t = 3 min	t = 5 min	t = 10 min	t = 15 min
1	50°C	10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-	10 <sup>-4</sup>
2	55°C	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>
3	60°C	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>-1</sup>	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>-1</sup>
4	65°C	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>

### III. Ejemplo de resultados de un ensayo en el equipo MEF

\* En las imágenes, de derecha a izquierda se muestran las diluciones en el orden: 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>.

#### 1. Ensayo 50°C, 300 V y 1200 Hz



Fila 1 → población inicial a t = 0 min Dilución 10<sup>-4</sup> por triplicado. Dilución 10<sup>-3</sup> por duplicado. Las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> se siembran una vez.

Filas 2, 3 y 4 → t = 5 min; t = 10 min y t = 15 min; respectivamente. Se realizan triplicados de las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>. De la dilución 10<sup>0</sup> las placas solo se siembran una vez.

### III.I. Diluciones sembradas por triplicado en ensayos MEF

		t = 0 min	t = 3 min	t = 5 min	t = 10 min	t = 15 min
1	50°C, 300 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>
2	55°C, 300 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>
3	60°C, 300 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
4	65°C, 300 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>0</sup> , 10 <sup>-1</sup>
5	60°C, 275 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
6	60°C, 250 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
7	60°C, 300 V, 60 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
8	60°C, 250 V, 60 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
9	55°C, 300 V, 60 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
10	55°C, 250 V, 1200 Hz	10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>