

# Universidad Politécnica de Valencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



## **INACTIVACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 Y ASCOSPORAS DE *Zygosaccharomyces rouxii* EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD.**

**MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

Autor: Vanesa Boullosa López

Director: Antonio Martínez López

Codirigido: Edwin Fabián Torres Bello

Gerardo González Martínez

Centro: IATA-CSIC

Valencia, junio 2013

# INACTIVACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 Y ASCOSPORAS DE *Zygosaccharomyces rouxii* EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD.

Boullosa, V.<sup>1</sup>, Torres, E.F.<sup>2</sup>, Martínez, A.<sup>2</sup> & González, G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Politécnica de Valencia (UPV) Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, España.

<sup>2</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico 46980 Paterna, Valencia, España.

<sup>3</sup> Instituto Alpina de Investigación Km 3 Vía Sopo Briceño- Cundinamarca, Colombia

## RESUMEN

La tecnología de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI) es una técnica de conservación no térmica que ha demostrado ser eficaz preservando las características propias de los alimentos, y reduciendo en gran medida los niveles de microorganismos y enzimas alterantes en el producto. Se ha demostrado que el tratamiento mediante PEAJ es más eficaz al combinarse con temperaturas moderadas (20-50°C). En este estudio, se evaluó la capacidad de la tecnología de PEAJ frente a dos tipos de microorganismos presentes en zumos de naranjas, *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 516) y *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT 10312), patógeno y alterante respectivamente. Estos microorganismos se inocularon en una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/mL en zumo de naranja pasteurizado, este se trató mediante PEAJ a intensidades de campo de entre 25 y 40 kV/cm, tiempos entre 20 y 500  $\mu$ s y temperaturas de 5, 25 y 40°C. Los resultados obtenidos evidenciaron una reducción significativa de la carga inicial inoculada, siendo la máxima reducción para *E. coli* O157:H7 de  $3,76 \pm 0,066$  unidades logarítmicas cuando se aplicaron 25 kV/cm, 340  $\mu$ s con una temperatura del baño de 40°C. Sin embargo, para *Z. rouxii*, el tratamiento más efectivo fue de 35 kV/cm, 250  $\mu$ s, 40°C, logrando una reducción de  $3,82 \pm 0,075$  unidades logarítmicas frente a la muestra de zumo no tratada.

**PALABRAS CLAVE:** Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad, *Escherichia coli*, *Zygosaccharomyces rouxii*, ascosporas, zumo de naranja.

## RESUM

La tecnologia de Pulsos Eléctrics d'Alta Intensitat (PEAJ) es una técnica de conservació no tèrmica que ha demostrat ser eficaç preservant les característiques pròpies dels aliments, i reduint en gran mesura els nivells de microorganismes i enzims alterants en el producte. S'ha demostrat que el tractament mitjançant PEAJ és mes eficaç al combinar-se amb temperatures moderades (20-50°C). En aquest estudi, es va evaluar la capacitat de la tecnologia de PEAJ front a dos tipus de microorganismes presents en sucs

de taronja, *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 516) i *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT 10312), patògen i alterant respectivament. Aquest microorganismes es varen inocular en una concentració de  $1 \times 10^8$  ufc/mL en suc de taronja pasteuritzada i va tractar mitjançant PEAI a intensitats de camp d'entre 25 i 40 kV/cm, temps entre 20 i 500  $\mu$ s y temperatures de 5, 25 i 40°C. Els resultats obtinguts van evidenciar una reducció significativa de la càrrega inicial inoculada, siguent la màxima reducció per a *E. coli* O157:H7 de  $3,76 \pm 0,066$  unitats logarítmiques quan es van aplicar 25 kV/cm, 340  $\mu$ s amb una temperatura del bany de 40°C. No obstant això, per a *Z. rouxii*, el tractament més efectiu va ser de 35 kV/cm, 250  $\mu$ s, 40°C, aconseguint una reducció de  $3,82 \pm 0,075$  unitats logarítmiques davant la mostra de suc no tractada.

**PARAULES CLAU:** Polsos Eléctrics d'Alta Intensitat, *Escherichia coli*, *Zygosaccharomyces rouxii*, ascospores, suc de taronja.

## ABSTRACT

High Intensity Pulsed Electric Field (HIPEF) processing is a nonthermal preservation treatment that has been proven to be effective in preserving food characteristics, and reducing levels of spoilage microorganisms and enzymes in product. Has been shown treatments are more effective when combined with moderate temperatures (20-50°C). In this study were evaluated the capacity of HIPEF versus two types of microorganisms which are present in orange juice, *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 516) and *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT 10312), pathogen and spoilage respectively. These microorganisms were inoculated at a  $1 \times 10^8$  cfu/mL concentration in pasteurized orange juice sample and treated by HIPEF at 25 to 40 kV/cm field strengths, 20 to 500  $\mu$ s and 5, 25 and 40°C temperatures. The results showed a significant reduction in the initial charge inoculated, and the maximum reduction for *E. coli* O157:H7 of  $3,76 \pm 0,066$  log when 25 kV/cm, 340  $\mu$ s applied and a bathe temperature of 40°C. However, to *Z. rouxii*, most effective treatment was 35 kV/cm, 250  $\mu$ s, 40°C, achieving a  $3,82 \pm 0,075$  log reduction compared with untreated juice sample.

**KEY WORDS:** High Intensity Electric Field, *Escherichia coli*, *Zygosaccharomyces rouxii*, ascospores, orange juice.

## INTRODUCCIÓN

El zumo de naranja es uno de los zumos de frutas más consumidos en todo el mundo, en Estados Unidos, constituyen el 30-32% de la ingesta total de frutas de la dieta (Meng et al., 2013), por lo que existe un gran interés por parte de los consumidores para que este tipo de producto conserve las características sensoriales y nutritivas del zumo recién exprimido (Bonilla, 2004). Por ello las empresas productoras de zumo de naranja buscan aplicar nuevas tecnologías que les permitan adaptarse mejor a las necesidades del mercado y preferencias de los consumidores.

Actualmente los zumos se pasteurizan térmicamente a temperaturas que oscilan entre 80 y 100°C durante menos de un minuto, estos procesos provocan alteraciones indeseables en el alimento tales como la pérdida de sabor, aroma, vitaminas y características físicas propias del zumo recién exprimido. En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías de procesado no térmico, como son las altas presiones hidrostáticas, la irradiación de alimentos, la aplicación de pulsos de luz o los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI). Esta última tecnología ha demostrado ser eficaz preservando las características del producto fresco de varios alimentos líquidos a la vez que permite disminuir hasta unos niveles deseables los microorganismos y la concentración de enzimas (Walking-Ribeiro et al., 2009).

La tecnología de PEAJ, es una técnica de conservación no térmica basada en la aplicación de una diferencia de potencial sobre el alimento, de forma que se crea una corriente eléctrica a través del producto. Esta corriente eléctrica provoca un cambio de potencial en las membranas celulares y consecuentemente una formación de poros en la misma. Cuando la formación de estos poros es masiva y permanente se produce la muerte del microorganismo por la dificultad de mantener el equilibrio osmótico y la rotura celular. (Barbosa-Canovas et al., 2001). En esta tecnología se aplican pulsos eléctricos de intensidades de entre 10 y 80 kV/cm y tiempos de tratamiento cortos, entre 50 y 2000  $\mu$ s. Teniendo en cuenta que el uso de estos tratamientos tienen como finalidad evitar los cambios físico-químicos provocados por las altas temperaturas del zumo, a tal efecto se aplican tratamientos en los que la temperatura del producto no supere los 60°C.

Según diversos estudios (Rasgoti, 2003, Van Loey et al., 2002, Espachs-Barroso et al., 2003) los tratamientos de PEAJ consiguen una inactivación de diversos microorganismos patógenos y alteradores. La reducción microbiana debida a los PEAJ se ha relacionado directamente con un aumento de la intensidad de campo del tratamiento (Bazhal et al., 2006) y la temperatura (Hemawan et al., 2004). Sin embargo actualmente no se cuenta con suficientes estudios que reflejen la eficacia de los tratamientos con PEAJ para la inactivación de *E. coli* O157:H7 y *Z. rouxii* esporulada en un medio ácido como es el zumo de naranja.

*E. coli* O157:H7 es una cepa causante de toxiinfección alimentaria y ha sido aislada en brotes importantes relacionados con los zumos de

frutas. Entre 1995 y 2005 se documentaron en EEUU cinco brotes de *E. coli* O157:H7 directamente asociados con el consumo de este tipo de producto (Vojdani et al., 2008). Por este motivo, resulta interesante su estudio en relación con los tratamientos de PEAI y una futura utilización en la industria alimentaria.

Por otro lado, el género *Zygosaccharomyces*, es responsable del deterioro de alimentos, especialmente jarabes y zumos de frutas debido a su alto contenido en azúcares. La contaminación de alimentos por este tipo de levadura produce crecimiento visible en superficie, fermentación, aromas no deseados, aparición de burbujas y deformación del empaquetado (Smith et al., 2004). Dentro de este género, la especie *Z. rouxii*, es causante de las mayores pérdidas en este tipo de productos, debido a que resiste ácidos débiles, presiones osmóticas extremas y tiene la capacidad de fermentar azúcares hexosas tal como indican James y Strafford (2003) lo que lo hace resistente a los métodos de limpieza y desinfección utilizados generalmente en las industrias alimentarias (Martorell-Guerola, 2006). Cabe destacar también, que la temperatura mínima de inhibición *Z. rouxii* en estado vegetativo es de 47°C aproximadamente y que otras especies del género *Zygosaccharomyces* han mostrado una mayor termotolerancia en medios con una concentración de glucosa elevada, como puede ser la matriz del zumo de naranja, resistiendo algunas colonias hasta 70°C durante 20 minutos a concentraciones de glucosa de 3 a 3,5 M (Martorell et al., 2007). Con todo esto, las ascosporas de *Z. rouxii* han mostrado ser sensiblemente más resistente a los tratamientos por calor que las células vegetativas (Jermiñi & Schimidt-Lorenz, 1987), sin embargo no ha sido publicada por el momento información suficiente sobre el efecto que tienen los tratamientos mediante PEAI sobre la tasa de inactivación de ascosporas de esta levadura.

Por todo lo expuesto anteriormente el propósito de este estudio fue evaluar la capacidad de la tecnología de PEAI en el control del patógeno *E. coli* O157:H7 y el alterador *Z. rouxii* en zumo de naranja, determinando los tratamientos más efectivos de tiempo, temperatura e intensidad, para lograr la inactivación de estos microorganismos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En este trabajo se utilizó un zumo de naranja natural comercial pasteurizado, refrigerado a 4°C sin pulpa. El zumo se filtró con un tamaño de luz de 0,300 mm en condiciones de esterilidad y se conservó a 4°C. El pH del zumo de naranja utilizado para el estudio fue de 3,71, este se midió mediante un pH-metro modelo GLP-21 (Crison, España), en cuanto al valor de la conductividad esta resultó ser 0,105±0,079 S/m, la medida se llevó a cabo con un conductímetro GLP-31 (Crison, España).

## Preparación de los cultivos

Se partió de un criovial de la cepa de *E. coli* O157:H7 (CECT 516) proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo, con una concentración inicial de  $1 \times 10^8$  ufc/mL. A este se le realizaron diluciones seriadas y posteriormente se inoculó en un matraz que contenía 500 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España). Este caldo inoculado se incubó a 37°C en agitación a 70 r.p.m. durante ocho horas con el fin de obtener células en fase estacionaria. Posteriormente, el caldo se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C por duplicado, el sobrenadante se eliminó y se resuspendió el precipitado tras cada centrifugación con 100 mL TSB. Tras terminar la segunda etapa de centrifugación y adicionar nuevamente caldo TSB, se tomó 1 mL del resuspendido y se depositó en crioviales con 1 mL de glicerol al 20 % en TSB. Al finalizar este proceso, se obtuvieron crioviales a una concentración de  $1,12 \times 10^8$  ufc/mL, estos se almacenaron a -80°C hasta la realización del tratamiento.

En cuanto a la cepa de *Z. rouxii* (CECT 10312), esta provenía igualmente de la Colección Española de Cultivos Tipo, y se siguió la metodología explicada anteriormente para preparar un stock homogéneo de células en estado estacionario, aunque cabe resaltar que en este caso se utilizó caldo Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) (1% extracto de levadura, 2% agua de peptona y 2% glucosa) (Pribylova et al., 2007). El siguiente paso consistió en la preparación de un cultivo de *Z. rouxii* en esporulación, para ello se transfirió 1 mL del stock en fase estacionaria a un matraz que contenía 500 mL de caldo YPD, suplementado con 5 g de Acetato Potásico con la finalidad de iniciar la esporulación. Este caldo, se incubó a 29°C con agitación continua de 100 r.p.m. durante 72 horas. Se prepararon un total de 50 crioviales cada uno con un volumen de 2 mL, cada criovial contenía 1 mL de la suspensión de células esporuladas a una concentración final de  $1,58 \times 10^8$  ufc/mL y 1 mL de glicerol al 20% en caldo YPD. El conteo de ascosporas del stock obtenido se valoró mediante microscopía en una cámara de Neubauer (Brand®, Wertheim, Alemania), para comprobar la presencia de esporas. La concentración fue de  $1 \times 10^8$  ascosporas de *Z. rouxii* por vial.

## Análisis microbiológico

Tras el tratamiento con PEAI, se tomaron muestras del zumo de naranja en tubos estériles, y se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona estéril tamponada al 0,1 % (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España), estas diluciones se sembraron en placa en profundidad utilizando Potato Dextrose Agar (PDA) (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España) suplementado con cloranfenicol (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España) e incubadas durante 5 días a 25 °C para el recuento de *Z. rouxii*. El Tryptocase Soy Agar (TSA) (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España) incubado durante  $24 \pm 3$ h a 37 °C, se utilizó como medio para la detección del crecimiento de células viables de *E. coli* O157:H7. Una vez terminada la

incubación se llevó a cabo un recuento de forma manual en cada una de las muestras. Los efectos de la inactivación por tratamiento de PEAI se expresaron como  $\text{Log}_{10} N/N_0$ , donde  $N_0$  era el número inicial de microorganismos en el control no tratado y  $N$  correspondía al número de células viables después del tratamiento por PEAI.

### **Determinación de tratamientos y equipo de pulsos.**

El equipo con el que se realizó el ensayo, OSU-4D (Ohio State University, EEUU), permite un trabajo continuo con pulsos bipolares, una amplitud de pulso de entre 1 y 20 kV/cm y una frecuencia de entre 40 y 4000 p.p.s., alcanzando una intensidad de campo eléctrico máxima de 40 kV/cm. Como se observa en la figura 1, el equipo consta de un generador de voltaje, hasta un máximo de 13 kV y una bomba que impulsa el zumo hacia las 8 cámaras de tratamiento. Una serie de tubos conectan la cámara de tratamiento con el baño para mantener la temperatura del producto durante el procedimiento. Las temperaturas del zumo durante el proceso son registradas mediante unos termopares conectados a la entrada y la salida de las cámaras.



**FIGURA 1.** Equipo de PEAI OSU-4D

## Tratamientos por pulsos eléctricos

El zumo de naranja se inoculó en condiciones de esterilidad con las cepas de *E. coli* O157:H7 o *Z. rouxii*, la matriz inoculada se mantuvo refrigerada y en agitación continua durante todo el tiempo que duró el tratamiento. Las condiciones de tratamiento se detallan en la tabla 1 y fueron realizados para las temperaturas del baño de 5, 25 y 40°C para cada intensidad de campo.

**TABLA 1.** Tratamientos de Pulsos Eléctricos aplicados. Bipolar 2 µs ancho.

25kV/cm	35kV/cm	40kV/cm
0 µs	0 µs	0 µs
30 µs	30 µs	30 µs
60 µs	60 µs	60 µs
120 µs	120 µs	80 µs
180 µs	180 µs	100 µs
240 µs	200 µs	120 µs
340 µs	220 µs	180 µs
500 µs	250 µs	

## Cinéticas de inactivación por PEAI

Se eligió el modelo de distribución de Weibull por ser ampliamente utilizado para describir curvas de inactivación por PEAI, por su simplicidad y por adaptarse adecuadamente, debido a su gran flexibilidad, a la interpretación de curvas inactivación no logarítmicas (Pataro et al., 2011, Saldaña et al., 2010 y Sampedro et al., 2006). El modelo consiste en una distribución de frecuencias que valora al microorganismo como una población, donde cada individuo posee una resistencia al tratamiento diferente, por lo que las curvas de inactivación representarán la distribución de la resistencia del conjunto de la población al tratamiento (Ecuación 1).

$$S(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{b}\right)^n\right) \quad (1)$$

Donde S es la fracción de microorganismos supervivientes, t es el tiempo de tratamiento expresado en µs, b es el parámetro de escala expresado en kV/cm y está relacionado con la intensidad del tratamiento y n es el parámetro de forma y está relacionado con la forma de la gráfica de supervivencia.

Cuando el valor de  $n < 1$ , las curvas de supervivencia presentan colas y la fracción residual de células que quedan por inactivar a tiempos largos tienen menos probabilidades de morir, ya que son las más resistentes, o las que mejor se han adaptado al estrés producido por los tratamientos. Cuando el valor de  $n > 1$ , las curvas de supervivencia presentan hombros, por lo que



para tiempos cortos de tratamiento, las células son resistentes hasta un punto en el que tiempos más largos de tratamiento se traducen en niveles mayores de inactivación. En el caso que el valor de  $n=1$  la probabilidad de que el microorganismo muera no depende del tiempo de tratamiento ya que cada célula es igual de sensible sin importar lo que dure el mismo.

### **Análisis estadístico**

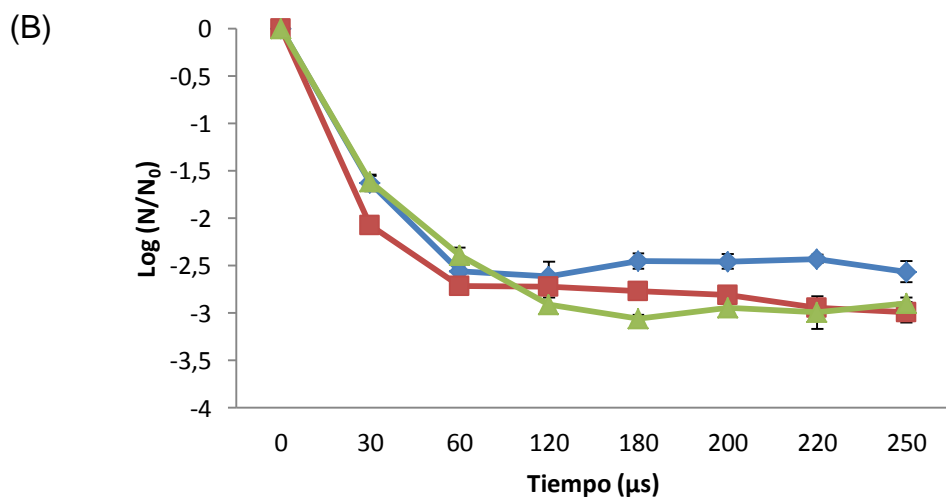
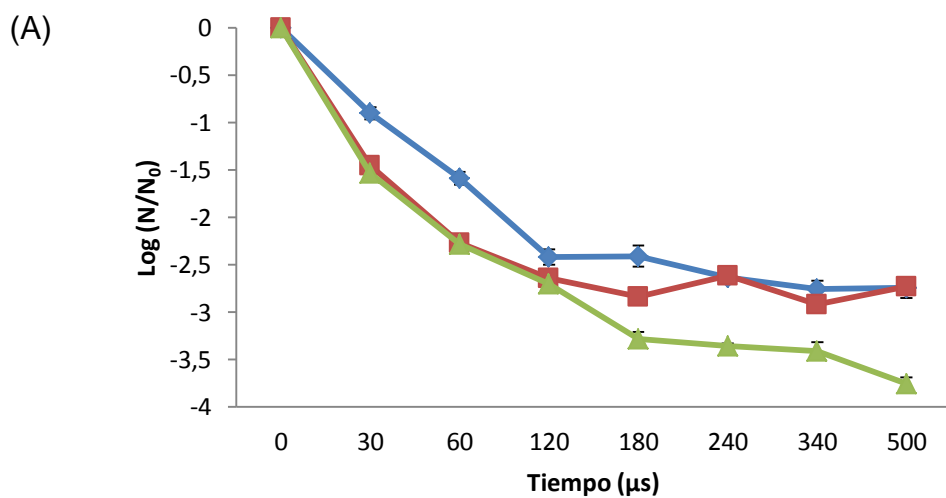
Para la evaluación del efecto de la intensidad del campo eléctrico aplicado, el tiempo y la temperatura en la inactivación de *E. coli* O157:H7 y *Z. rouxii* mediante PEAI, se ha realizado un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias con un nivel de confianza del 95%. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo matemático de regresión no lineal, como se mostró anteriormente. Todos los datos estadísticos se han analizado mediante el programa informático Statgraphics centurion XV, StatPoint, Inc.

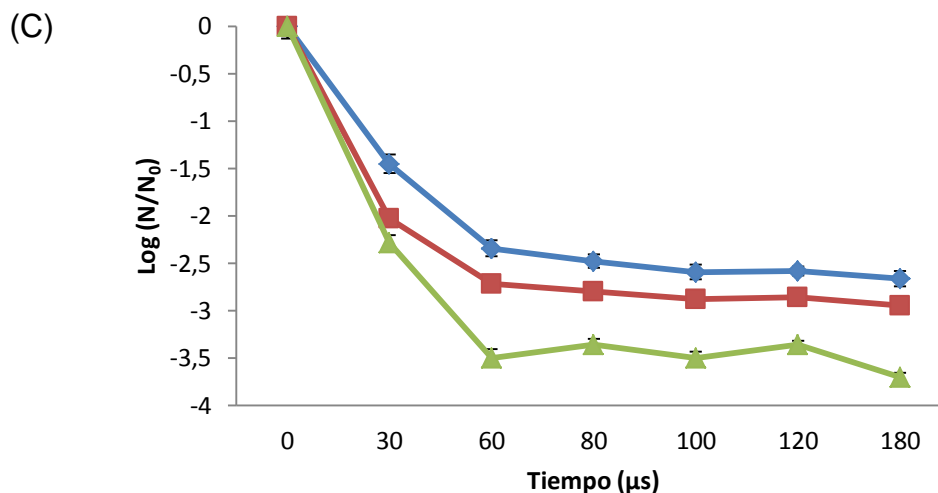
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para una mayor comprensión de los resultados, se compararon gráficamente las diferentes intensidades de campo y temperaturas tal y como se muestra a continuación. Como se aprecia en la figura 2A, cuando se aplicó un tratamiento con una intensidad de campo de 25 kV/cm durante un tiempo de 180  $\mu$ s, la concentración de células viables de *E. coli* O157:H7 decreció hasta  $2,4\pm 0,08$ ,  $2,83\pm 0,09$  y  $3,28\pm 0,08$  ciclos logarítmicos cuando se aplicaron temperaturas de 5, 25 y 40°C respectivamente. Por otro lado, al incrementar la intensidad de campo a 35 KV/cm durante el mismo tiempo de tratamiento (180  $\mu$ s), se obtuvieron unas reducciones logarítmicas de  $2,45\pm 0,08$ ,  $2,77\pm 0,04$  y  $3,06\pm 0,04$  a las siguientes temperaturas de tratamiento 5, 25 y 40°C (figura 2B). Una tendencia de inactivación similar fue observada anteriormente por Elez-Martinez et al., (2006), y se obtuvo también a la máxima intensidad de campo aplicada. Esta intensidad de campo máxima fue de 40 kV/cm a 180  $\mu$ s y logró una disminución máxima de  $2,66\pm 0,08$  a 5°C,  $2,94\pm 0,08$  a 25°C y  $3,7\pm 0,05$  a 40°C como se puede ver en la figura 2B.

La aplicación de diferentes intensidades de campo, por sí misma, no consiguieron unas reducciones significativas ( $P>0,05$ ) en los recuentos de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, al combinar la intensidad de campo aplicada en los tratamientos de PEAI con una mayor temperatura y un aumento en el tiempo de tratamiento, se produjo un efecto sinérgico que consiguió reducir el número de microorganismos viables de *E. coli* O157:H7 en el zumo de naranja, esta sinergia concuerda con lo reportado anteriormente por Hodgins (2002) donde un incremento en la temperatura de 44°C a pH 3,5 y un tratamiento de 80 pulsos a una intensidad de campo de 80 kV/cm, aumenta el efecto de los PEAI reduciendo 1,75 ciclos logarítmicos la concentración de microorganismos.

A partir de los tiempos de tratamiento de 180, 120 y 60  $\mu\text{s}$  en intensidades de campo de 25, 35 y 40 kV/cm respectivamente, se generaron colas en las cinéticas de inactivación. Esto demuestra que a tiempos superiores no se presenta una reducción significativa en la carga inicial ( $P>0,05$ ). Con lo anteriormente expuesto, para un tratamiento de 25 kV/cm-40°C y 180  $\mu\text{s}$ , la máxima reducción obtenida fue de  $3,28\pm 0,08$  ciclos logarítmicos, por otro lado los tiempos comprendidos entre 180 y 500  $\mu\text{s}$  alcanzaron únicamente un incremento de la reducción microbiana de  $0,33\pm 0,06$  unidades logarítmicas para los recuentos de *E. coli* O157:H7. Este límite en la inactivación fue observado también por Jia et al., (1999), que refirieron una reducción microbiológica similar entre los tratamientos de 240 y 480  $\mu\text{s}$  a una intensidad de campo de 30 kV/cm.





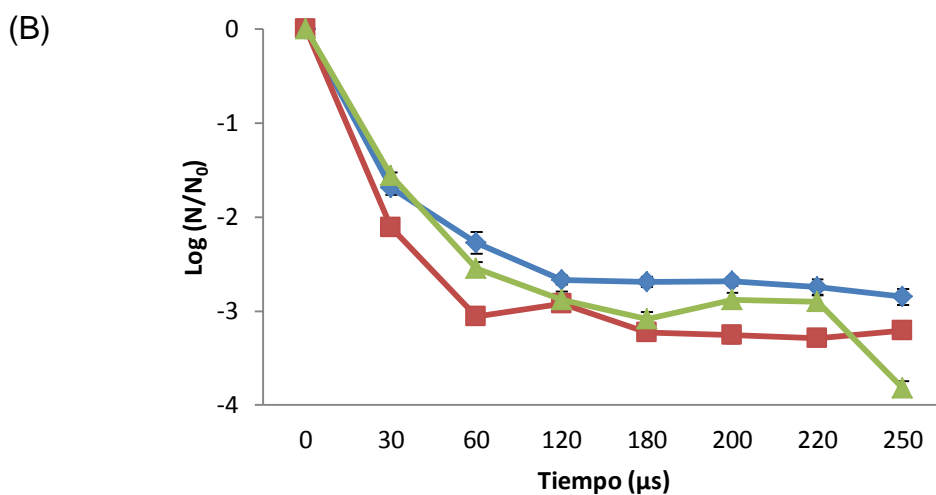
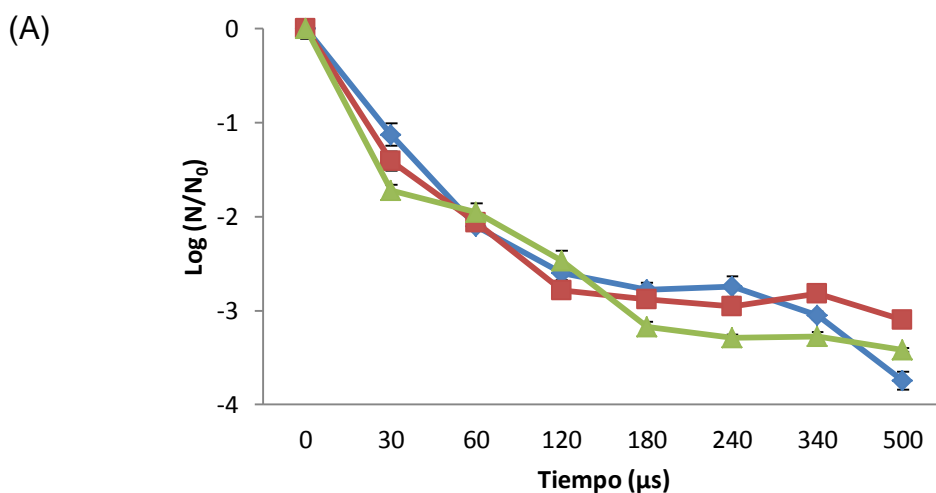
**FIGURA 2.** Inactivación de *E. coli* O157:H7 mediante PEAI en zumo de naranja a intensidades de campo (A) 25 kV/cm, (B) 35 kV/cm, (C) 40 kV/cm y temperaturas (◆) 5°C, (■) 25°C, (▲) 40°C.

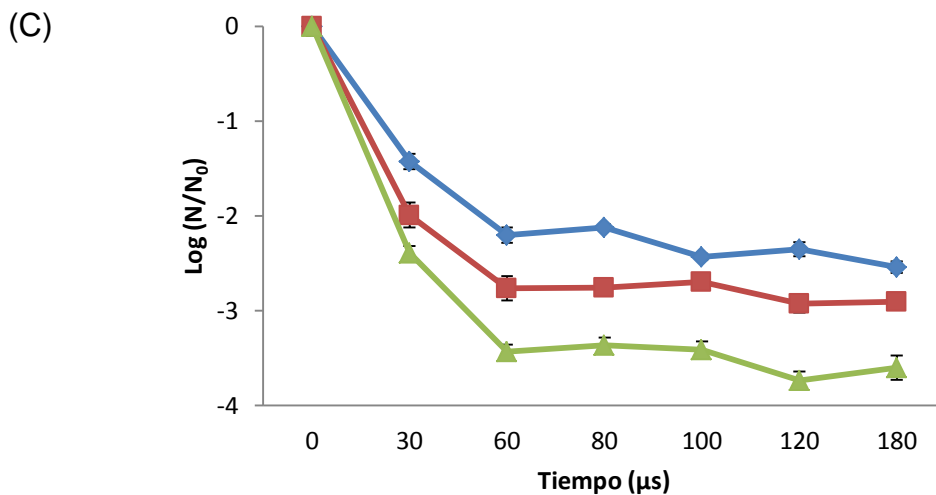
Tal y como se puede observar en la figura 3, en los recuentos de *Z. rouxii* se generaron colas a partir de los tiempos de tratamiento a 180, 120 y 60  $\mu$ s en intensidades de campo de 25, 35 y 40 kV/cm respectivamente. De la misma forma a como se ha podido observar en las curvas de inactivación de *E. coli* O157:H7, los tiempos superiores no presentaron una reducción significativa de la carga inicial del microorganismo ( $P > 0,05$ ). En cuanto al tratamiento de 40 kV/cm-60  $\mu$ s y una temperatura de 25°C, la reducción microbiana fue de  $2,8 \pm 0,08$  ciclos logarítmicos, mientras que para los tiempos comprendidos entre 80 a 180  $\mu$ s, se produjo un incremento de la reducción microbiana en  $0,14 \pm 0,07$  unidades logarítmicas en los recuentos de *Z. rouxii*.

Por otra parte, el aumento de los tiempos de tratamiento fue el factor más decisivo en la disminución de colonias viables del microorganismo ( $P < 0,05$ ), ya que para una intensidad de campo de 40 kV/cm la disminución de células viables respecto del mismo tratamiento a 25 kV/cm fue de 0,43 reducciones logarítmicas, empleando los mismos tiempos y temperaturas de tratamiento (180  $\mu$ s-40°C). En comparación la diferencia entre la aplicación de 30  $\mu$ s y de 500  $\mu$ s con idénticos parámetros de intensidad y temperatura (25 kV/cm-5°C) resultaron en una disminución de células viables de  $2,61 \pm 0,07$  unidades logarítmicas.

Cabe destacar que la disminución obtenida al aplicar el tratamiento de 25 kV/cm, 5°C y 500  $\mu$ s para la población microbiana de *Z. rouxii* fue de  $3,74 \pm 0,094$  ciclos logarítmicos y que esta resultó la máxima reducción alcanzada. Sin embargo, una temperatura de tratamiento mayor (40°C) a 25 kV/cm-500  $\mu$ s logró una reducción de  $3,42 \pm 0,02$  unidades logarítmicas similar a la obtenida a la temperatura de 5°C. Por lo anteriormente expresado se observa que la temperatura de tratamiento no es el factor más relevante en la disminución de la población de *Z. rouxii* en este estudio, aunque se observó sinergia positiva entre los tratamientos PEAI y el aumento de la temperatura de tratamiento, generando una mayor

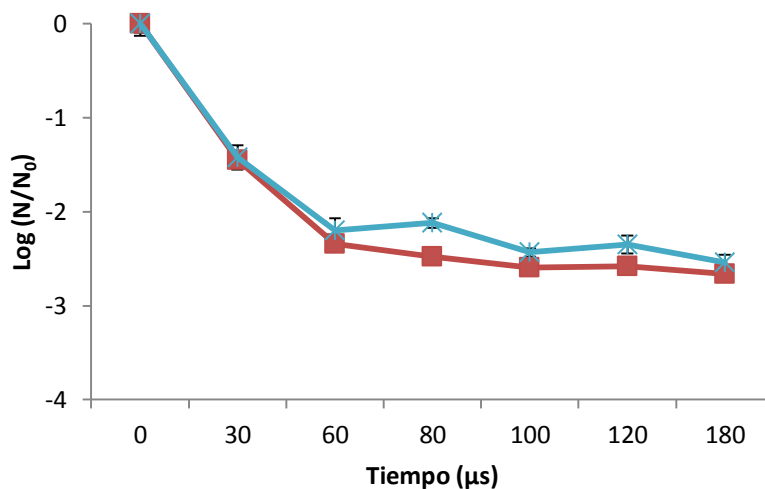
inactivación de levaduras, como se puede observar en la figura 3. Por tanto, la máxima reducción de *Z. rouxii* se obtuvo al aplicar una intensidad de campo de 35 kV/cm, una temperatura de 40°C y un tiempo de tratamiento de 250  $\mu$ s, generando una disminución de  $3,82 \pm 0,075$  unidades logarítmicas frente al control no tratado. Estos datos concuerdan con los estudios publicados anteriormente por Raso (2006), donde utilizando ascosporas de *Zygosaccharomyces bailii*, se logró una reducción máxima de 3,5-4 unidades logarítmicas mediante la aplicación de intensidades de campo de 32 a 36,5 kV/cm y una 20°C.





**FIGURA 3.** Inactivación de *Z. rouxii* mediante PEAI en zumo de naranja a diferentes intensidades de campo (A) 25 kV/cm, (B) 35 kV/cm, (C) 40 kV/cm y temperaturas (◆) 5°C, (■) 25°C, (▲) 40°C.

Como se puede observar en la figura 3, se alcanzaron disminuciones logarítmicas de *Z. rouxii* ligeramente menores a las mostradas para *E. coli* O157:H7, esto concuerda con los resultados obtenidos en trabajos similares, donde las esporas presentan una mayor resistencia a los PEAI que las bacterias gram negativas. McDonald et al. (2000) consiguieron 2,5 reducciones logarítmicas en ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando 50 kV/cm-50°C en zumo de naranja, mientras que al aplicar 30 kV/cm-55°C consiguió 3 reducciones logarítmicas en *E. coli*. Mosqueda-Melgar et al. (2007) en zumo de sandía y melón y El-Hag et al. (2006) en zumo de naranja obtuvieron resultados similares de inactivación a los obtenidos en el presente,  $3,74 \pm 0,094$  reducciones logarítmicas para *Z. rouxii* y  $3,75 \pm 0,07$  en el caso de *E. coli* O157:H7.



**FIGURA 3.** Curva de Inactivación de (■) *E. coli* O157:H7 y (\*) *Z. rouxii*. Tratamiento 40 kV/cm-25°C.

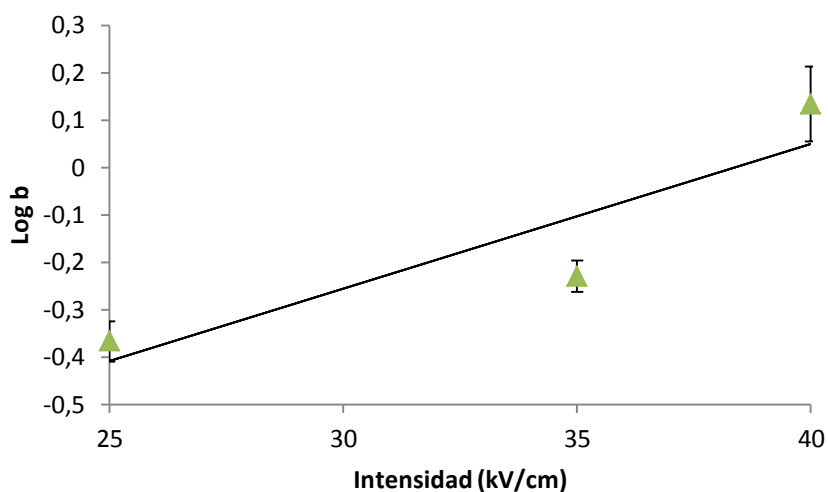
## Modelización matemática

Se calcularon los parámetros cinéticos  $b$  y  $n$  del modelo de Weibull y los indicadores de la bondad del ajuste ( $R^2$ -ajustado y error cuadrático medio o MSE) para los datos de supervivencia de *E. coli* O157:H7, los resultados se pueden ver en la tabla 2. El parámetro  $b$  es un parámetro de escala y muestra la resistencia del microorganismo al tratamiento. En los datos experimentales obtenidos se pudo advertir el aumento claro de este parámetro a medida que se incrementaba la temperatura del tratamiento, evidenciando una mayor sensibilidad del patógeno a esta variable. Por otro lado se observó que la correlación del parámetro  $b$  con la intensidad de campo solo presentó esta relación entre 25 y 35 kV/cm, y a 40 kV/cm el parámetro de  $b$  fue menor de los esperado, no siendo esta disminución estadísticamente significativa ( $P>0,05$ ). En cuanto al parámetro  $n$ , no superó en ningún caso un valor de 1 para las cinéticas de inactivación de *E. coli* O157:H7, por tanto se presentaron colas a medida que los tratamientos se volvieron más intensos. Los valores de  $R^2$ -ajustado fueron superiores al 93%, lo que significa que el modelo de Weibull describió con precisión las curvas de inactivación de los tratamientos.

**TABLA 2.** Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia de *E. coli* O157:H7.

Intensidad kV/cm	Temperatura °C	Weibull		$R^2$ - ajustado	MSE
		$b$	$n$		
25	5	0,205894	0,488586	96,3524	0,0520272
	25	0,542366	0,325442	98,2002	0,0321417
	40	0,734973	0,269276	97,6765	0,0426583
35	5	1,04018	0,181496	93,9851	0,0988311
	25	1,20669	0,158408	93,1966	0,0902949
	40	1,41796	0,135224	98,2132	0,0334444
40	5	0,64962	0,281326	96,6861	0,0553082
	25	1,1769	0,18278	98,5361	0,0296605
	40	1,31833	0,205448	96,2434	0,0789632

Se realizó además el ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo para las temperaturas de trabajo empleadas. Mediante este ajusté se comprobó que la relación entre las variables logaritmo de  $b$  y temperatura era lineal y positiva, y que un aumento de temperatura disminuía la cantidad de células viables en el zumo de naranja. En la figura 4 se puede observar un ejemplo de ajuste lineal del logaritmo de  $b$  para los tratamientos a 40°C.



**FIGURA 4.** Ejemplo de ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull de *E. coli* O157:H7 a ( $\blacktriangle$ ) 40°C e intensidades de campo de 25, 35 y 40 kV/cm.

Con el fin de comprobar la intensidad de campo requerida para disminuir 1 unidad el logaritmo de  $b$  para cada temperatura, se calculó el valor  $Z$  de la intensidad ( $Z_i$ ). El valor de  $Z_i$  para *E. coli* O157:H7 observado en este estudio fue de  $31,3 \pm 4,87$  kV/cm, tal y como se muestra en la tabla 3.

**TABLA 3.** Valor  $Z_i$  para *E. coli* O157:H7 a intensidades de campo de 25, 35 y 40 kV/cm y temperaturas de 5, 25 y 40°C.

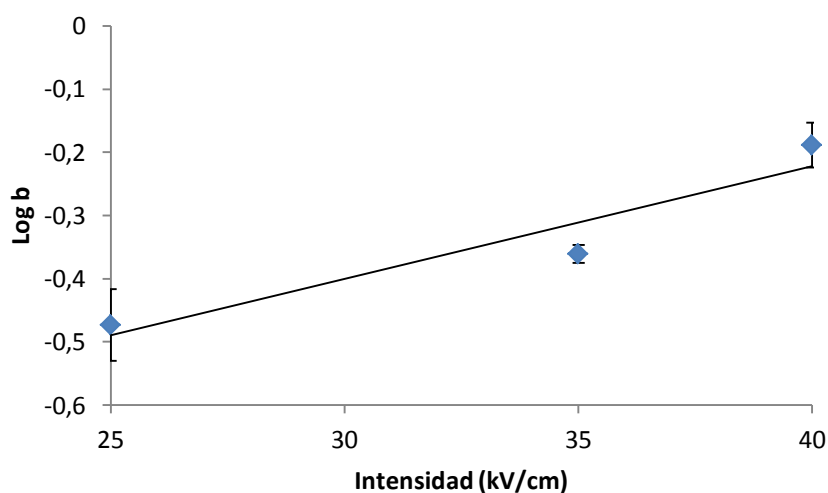
Temperatura (°C)	Valor de $Z_i$
5	35,3143
25	32,7869
40	25,9067

De igual forma, el modelo de Weibull se ajustó adecuadamente para la descripción de la fracción de células supervivientes de *Z. rouxii*. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtenido para los diferentes niveles de tratamiento estuvo comprendido entre 93,19 y 98,53%. Los valores del parámetro  $b$  para *Z. rouxii* siguen una tendencia ascendente junto con el aumento de la temperatura, de manera similar a lo observado para *E. coli* O157:H7 (tabla 4). De igual modo se observó que existió correlación entre la intensidad de campo y el parámetro de  $b$ , excepto para 35 kV/cm a 25 y 40°C, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

**TABLA 4.** Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia de *Z. rouxii*.

Intensidad Temperatura		Weibull		R <sup>2</sup> - ajustado	MSE
kV/cm	°C	b	n		
25	5	0,336351	0,416672	96,835	0,056557
	25	0,501145	0,336233	97,0395	0,0510702
	40	0,764583	0,25178	96,9702	0,0485276
35	5	0,435726	0,339228	98,7294	0,013747
	25	0,460901	0,364276	97,8125	0,0359591
	40	0,6607	0,29641	93,8536	0,0990141
40	5	0,647881	0,268774	97,5391	0,0356421
	25	1,18243	0,182581	97,6814	0,0477764
	40	1,39065	0,196136	97,0667	0,0621232

De igual modo se realizó el ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull para *Z. rouxii* ajustado a las diferentes temperaturas de trabajo. En la figura 5 se puede observar un ejemplo de ajuste lineal del logaritmo de  $b$  para los tratamientos a 5°C.



**FIGURA 5.** Ejemplo de ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull de *Z. rouxii* a (♦) 5°C e intensidades de campo de 25, 35 y 40 kV/cm.



El cálculo del valor Z para la intensidad de campo ( $Z_i$ ) de *Z. rouxii* se muestra en la tabla 5. Los valores de  $Z_i$  mostraron que era necesario aplicar unas intensidades de campo de 71,94, 55,87 y 48,08 kV/cm a las temperaturas de 5, 25 y 40°C respectivamente con la finalidad de disminuir una unidad el logaritmo de *b*. Por otra parte, al relacionar los valores de  $Z_i$  para los dos microorganismos estudiados, se apreció una mayor sensibilidad al tratamiento de PEAI de *E. coli* O157:H7 ( $Z_i=31,3\pm 4,87$  kV/cm) frente a *Z. rouxii* para las diferentes temperaturas, siendo necesario aplicar una mayor intensidad de campo para lograr reducir la carga inicial microbiana de *Z. rouxii*.

**TABLA 5.** Valor  $Z_i$  para *Z. rouxii* a intensidades de campo de 25, 35 y 40 kV/cm y temperaturas de 5, 25 y 40°C.

Temperatura (°C)	Valor de $Z_i$
5	71,9424
25	55,8659
40	48,0769

## CONCLUSIONES

La tecnología de PEAI ha demostrado ser efectiva para inactivar contaminaciones de *E. coli* O157:H7 y ascosporas de *Z. rouxii* en la matriz del zumo de naranja pasteurizado. Se ha comprobado que las células en estado de esporulación son más resistentes a los tratamientos por PEAI que las bacterias gram negativas. En cuanto a la tasa de inactivación, esta varió en función del tiempo de tratamiento y la temperatura aplicados, y en menor medida de la intensidad de campo del tratamiento. Mediante el uso de tratamientos de 25 kV/cm-40°C-500 $\mu$ s y 35 kV/cm-40°C-250 $\mu$ s se pudieron alcanzar reducciones logarítmicas de  $3,75\pm 0,07$  y  $3,82\pm 0,07$  para *E. coli* O157:H7 y *Z. rouxii* respectivamente. Esta tasa de inactivación, aunque no alcanzó los 5 ciclos logarítmicos de reducción exigidos por la FDA (FDA 2004), evidencia el efecto de los PEAI y por tanto permite continuar con la realización de estudios con el fin de modelizar la reducción microbiana.

También se ha podido demostrar que mayores intensidades de campo no siempre se traducen en mayores niveles de inactivación microbiana, ya que al utilizar tiempo de tratamiento de 180, 120 y 60  $\mu$ s a 25, 35 y 40 kV/cm respectivamente, para cualquier temperatura estudiada, se forman colas y los tratamientos más intensos dejan de ser más efectivos, tanto para *E. coli* O157:H7 como para ascosporas de *Z. rouxii*. Además se ha podido demostrar que el modelo de Weibull describe adecuadamente las cinéticas de inactivación tanto de *E. coli* O157:H7 como de ascosporas de *Z. rouxii*.

Este trabajo contribuye a aportar más datos sobre la cinética de inactivación de *E. coli* E157:H7 frente a los PEAI, pero sobre todo a aumentar el conocimiento sobre la sensibilidad de ascosporas de *Z. rouxii* al ser sometida a tratamientos de PEAI. Por otra parte, se aportan nuevos datos a los pocos trabajos disponibles hoy en día sobre este tema. Sería interesante en estudios futuros comprobar la sensibilidad de células vegetativas y ascosporas de *Zygosaccharomyces* a tratamientos de PEAI empleando tiempos de tratamiento más elevados y también en matrices de zumos naturales, lo que implementaría el uso de esta tecnología a nivel comercial.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Alpina de Investigación y al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, por hacer posible este trabajo.

## REFERENCIAS

- Barbosa-Cánovas, G. V.; Zhang, Q.; Tabilo-Munizaga, G. Pulsed electric fields in food processing: fundamental aspects and applications. Technomic cop. 2001.
- Bazhal, M. I.; Ngadi, M. O.; Raghavan, V. G. S. Combined effects of pulsed electric fields and temperatura on Escherichia coli O157:H7 innactivation. ASAE paper 03-1234, ASAE: St Joseph, MI. Annual International Meeting, July 13-16, 2003, Las Vegas, NV.
- Bonilla, T. Analysis of consumer preferences toward 100 % fruit juice packages and labels. B.S., Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 2004 August 2010.
- Elez-Martinez, P.; Soliva - Fortuny, R. C.; Martin - Belloso O. "Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment". European Food Research & Technology, Feb, 2006, Vol.222(3-4), p.321(9).
- El-hag A. H.; Jayaram, S. H.; Griffiths, M. W. Inactivation of Naturally Grown Microorganisms in Orange Juice Using Pulsed Electric Fields. IEEE Transactions on Plasma Science, 2006, Vol.34 (4), pp.1412-1415.
- Espachs-Barroso A.; Barbosa-Cánovas G. V.; Martín-Belloso, O. (2003). Microbial and enzymatic changes in fruit juice induced by hih-intensity pulsed electric fields, Food Review International, 19(3), 253-273.
- FDA 2004. Guidance for Industry. Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition. (<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/02d-0222-gdl0002.pdf>) February 2004.
- Hodgins, A. M.; Mittal, G. S.; Griffiths, M. W. "Pasteurization of fresh orange juice using low-energy pulsed electrical field". Journal of Food Science, August, 2002, Vol.67(6), p.2294-229.
- James, S. A.; Stratford, M. 2003. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), Yeasts in Food. Behr's Verlag, Hamburg, pp. 171–191.
- Martorell-Guerola, P. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions 2006.
- Martorell, P.; Malcolm, S.; Steels, H.; Fernandez-Espinar, M.T.; Querol, A. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. International Journal of Food Microbiology, 144 (2007) 234-242.

- McDonald, C. J.; Lloyd, S. W.; Viatle, M. A.; Petersson, K.; Innings, F. Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm". *Journal of Food Science*, Sept, 2000, Vol.65(6), p.984(6).
- Meng, Y.; Sang-Gil, L.; Ying, W.; Beate, L.; Sang-Jin, C.; Won, S. O.; Ock, C. K. Orange Juice, a Marker of Diet Quality, Contributes to Essential Micronutrient and Antioxidant Intakes in the United States Population. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, Available online 20 February 2013.
- Mosqueda-Melgar, J.; Raybaudi-Massilia, R. M.; Martín-Belloso, O. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 117 (2007) 192-200.
- Jermi, M. and Schimidt-Lorenz, W. 1987. Heat resistance of vegetative cells and asci of two *Zygosaccharomyces* yeasts in broths at different water activity values. *J. Food Prot.* 50: 835-841.
- Jia, M. Q.; Zhang\*, H.; Min, D. B. "Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice". *Food Chemistry* 65 (1999) 445-451.
- Pataro, G.; Senatore, B.; Donsi, G.; Ferrari, G. Effect of electric and flow parameters on PEF treatment efficiency. *Journal of Food Engineering* 105 (2011) 79-88.
- Pribylova, L.; Montigny, J.; Sychrova, H. Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* 2007; 24: 171-180.
- Rasgoti, N. K. (2003). Application of high-intensity pulsed electrical fields in food processing. *Food Reviews International*, 19(3), 229-251.
- Raso, J.; Calderón, M. L.; Góngora, M.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Swanson B. G. Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in Fruit Juices by Heat, High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Science*, volume 63, Issue 6, 20 Jul 2006.
- Saldaña, G.; Puértolas, E.; Condón, S.; Álvarez, I.; Raso, J. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in media of different pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (2010) 290-298.
- Sampedro, F.; Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A.; Rodrigo M. Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage. *European Food Research and Technology*. May 2006, volume 223, Issue 1, pp 30-34.
- Smith, J.P.; Daifas, D. P.; El-Khoury, W.; Koukoutsis, J. (2004) Shelf life and safety concerns of Bakery products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 19e55.
- Van Loey, A.; Verachert, B.; Hendrickx, M. (2002). Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends in Food Science and Technology*, 60, 1143-1146.
- Vojdani, J. D.; Beuchat, L. R.; Tauxe, R. V. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J Food Prot.* 2008 Feb;71(2):356-64.
- Walking-Ribeiro, M.; Noci, F.; Cronin, D. A.; Lyng, J. G.; Morgan, D. J. Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields. *Food and Bioproducts Processing* 87 (2009) 102-107.