

Aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche: efectos sobre *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, componentes nutricionales y calidad

ALEJANDRO RIVAS SOLER

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

**Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en
una bebida mezcla de zumo de naranja y leche:
Efectos sobre *Escherichia coli*, *Saccharomyces
cerevisiae*, componentes nutricionales y calidad.**

Presentada por:
ALEJANDRO RIVAS SOLER

Para optar al título de
DOCTOR por la
Universidad Politécnica de Valencia

Directores:
Dr. Antonio Martínez López
Dra. Maria Dolores Rodrigo Aliaga

Julio, 2012



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Esta editorial es miembro de la UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

© Alejandro Rivas Soler

Primera edición, 2012

© de la presente edición:

Editorial Universitat Politècnica de València

www.editorial.upv.es

ISBN: 978-84-8363-916-0 (versión impresa)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



D. Antonio Martínez López, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación del CSIC, y Dña. M^a Dolores Rodrigo Aliaga, Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia, Científico Titular del CSIC, ambos en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN que

D. Alejandro Rivas Soler, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche: Efectos sobre *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, componentes nutricionales y calidad”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 17 de Mayo de 2012

Fdo. D. Antonio Martínez López

Director de tesis

Fdo. Dña. M^a Dolores Rodrigo Aliaga

Directora de tesis

En primer lugar quiero dedicar esta Tesis a la memoria de D. Miguel Rodrigo Enguídanos, quien me permitió empezar en el mundo científico, tan deseado y tan frustrante a la vez. A quien debo valiosas palabras y consejos. Esta tesis no habría sido posible sin su dirección.

Quiero expresar mi gratitud a mis directores de Tesis, los Doctores Antonio Martínez López y María Dolores Rodrigo Aliaga por su dedicación, coordinación, orientación y consejos, sin los cuales este trabajo no habría podido llevarse a cabo.

A Loles, aparte de ser mi directora de Tesis Doctoral, es una amiga de la que he recibido apoyo, amistad, alegría y confianza. Espero que me perdone algún día aquellos días que le taladraba con mi música.

A todos los compañeros del laboratorio Javi, Fernando, Carmen, Chelo, Auri, Pilar, Daniela, Cheche y Fabián que antes y durante la realización de la Tesis me hicieron pasar buenos momentos. Javi, como ves, no hemos arreglado el mundo, pero porque no nos han hecho caso.

A los Drs. Marco Antonio Delgado y Elena Sánchez de Leche Pascual, a los Drs. Salvador Vallés, Paloma Manzanares y Manuel Zúñiga del IATA-CSIC, a los Drs. Miguel Blasco y Roberto Melis del AINIA y a la Dra. Sonia Rodríguez del Laboratorio de Proteómica del IATA-CSIC por su colaboración.

Al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) por poner a mi disposición todos los medios necesarios para la realización de la presente tesis, así como a la CICYT, que ha suvencionado la realización de estos estudios con el proyecto AGL 2003-05236-C02-01.

A todos mis amigos por su cariño y apoyo en todo momento, en especial a Raquel, Rebeca, Mar y Boro a los que considero de mi propia familia.

A Vicente y Laura por siempre recordarme que tenía un trabajo por finalizar y a mis sobrinos Vicente, Héctor y María, que durante mucho tiempo han traído alegría a mi vida.

Ante todo quiero dedicar esta tesis a **Chelo**, en principio como compañera, luego como amiga y finalmente como mi amor, me has aportado luz y alegría cuando pensaba que solo existía sombra y melancolía. Gracias por regalarme el significado de vivir.

Finalmente, te dedico esta tesis a ti, **Victor**, que ya no concibo mi vida sin tus risas ni tus “mamás”.

A mis padres

A Chelo y Víctor

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIV
RESÚMENES.....	XVII
I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	1
II. ANTECEDENTES.....	7
II.1 Tecnologías no térmicas de conservación de alimentos.....	9
II.2 Pulsos eléctricos de alta intensidad.....	11
II.2.1 Aspectos tecnológicos.....	11
II.2.2 Factores que determinan la inactivación por PEAI.....	15
II.2.2.1 Factores técnicos.....	15
II.2.2.2 Factores biológicos.....	22
II.2.2.3. Factores relacionados con el producto.....	24
II.2.3 Inactivación microbiológica por PEAI.....	26
II.2.3.1 Mecanismo de inactivación.....	26
II.2.3.2 Daño celular producido por el tratamiento.....	27
II.2.4 Inactivación enzimática por PEAI.....	29
II.2.5 Efecto de los PEF en componentes nutricionales.....	30
II.2.5.1 Vitaminas.....	31
II.2.5.2 Carotenoides.....	32
II.2.5.3 Proteínas.....	32
II.2.5.4 Actividad Antioxidante.....	33
II.2.6 Modelos cinéticos de inactivación.....	33
II.2.7 Aplicaciones de la tecnología de los PEAI.....	39
II.2.8 Costo económico y energético de la tecnología de los PEAI.....	40
II.2.9 Equipos existentes de tratamiento por PEAI.....	41
II.2.10 Ventajas y desventajas de la tecnología.....	43

II.2.11 Necesidades de investigación.....	44
III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	47
III.1 Objetivos.....	49
III.2 Plan de Trabajo.....	50
IV. RESULTADOS.....	53
<hr/>	
CAPÍTULO 1: NATURALEZA DE LA INACTIVACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> SUSPENDIDA EN UNA BEBIDA MEZCLA DE ZUMO DE NARANJA Y LECHE.	
<hr/>	
IV.1.1 Introducción.....	57
IV.1.2 Materiales y métodos.....	58
IV.1.2.1 Preparación de la bebida.....	58
IV.1.2.2 Preparación del cultivo de <i>E. coli</i>	58
IV.1.2.3 Inoculación de las muestras.....	59
IV.1.2.4 Equipo de tratamiento por PEAI.....	59
IV.1.2.5 Recuento de células viables.....	62
IV.1.2.6 Análisis estadístico.....	62
IV.1.2.7 Modelos de inactivación de <i>E. coli</i> por PEAI.....	63
IV.1.3 Resultados y discusión.....	64
IV.1.4 Conclusiones.....	69
IV.1.5 Referencias.....	70

CAPÍTULO 2: PARÁMETROS CINÉTICOS EN LA INACTIVACIÓN POR PEAI DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE: EFECTO DE LA TEMPERATURA.

IV.2.1 Introducción.....	77
IV.2.2 Materiales y métodos.....	78
IV.2.2.1 Preparación de la bebida.....	78
IV.2.2.2 Preparación del cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	79
IV.2.2.3 Tratamiento térmico.....	79
IV.2.2.4 Equipo de tratamiento por PEAI.....	79
IV.2.2.5 Recuento de células viables.....	80
IV.2.2.6 Análisis estadístico.....	80
IV.2.3 Resultados y discusión.....	82
IV.2.3.1 Efecto de la tecnología de los PEAI sobre el <i>S. cerevisiae</i>	82
IV.2.3.2 Modelización de las curvas de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i>	86
IV.2.4 Referencias.....	96

CAPÍTULO 3: MODELIZACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESADO POR PEAI Y TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA PECTINMETILESTERASA EN UNA BEBIDA DE ZUMO DE NARANJA Y LECHE.

IV.3.1 Introducción.....	103
IV.3.2 Materiales y métodos.....	104
IV.3.2.1 Preparación de la bebida.....	104
IV.3.2.2 Ensayo de la Pectinmetilesterasa.....	105
IV.3.2.3 Sistema de tratamiento por PEAI.....	105
IV.3.2.4 Diseño del estudio cinético.....	106

IV.3.2.5 Análisis estadístico.....	109
IV.3.3 Resultados.....	110
IV.3.3.1 Estudio de inactivación.....	110
IV.3.3.2 Estudio de la evolución de la temperatura.....	115
IV.3.3.3 Estudio cinético.....	117
IV.3.3.3.1 Calculo de los parámetros cinéticos.....	117
IV.3.3.3.2 Selección del modelo.....	121
IV.3.3.3.3 Simplificación del modelo Logístico.....	122
IV.3.4 Conclusiones.....	124
IV.3.5 Referencias.....	125

CAPÍTULO 4: EFECTO DE LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD EN VITAMINAS HIDROSOLUBLES Y PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ECA AÑADIDOS A UNA BEBIDA MEZCLA DE ZUMO DE NARANJA Y LECHE.

IV.4.1 Introducción.....	135
IV.4.2 Materiales and Métodos.....	137
IV.4.2.1 Preparación de la bebida.....	137
IV.4.2.2 Enriquecimiento con vitaminas.....	137
IV.4.2.3 Enriquecimiento con péptidos inhibidores de la ECA.....	138
IV.4.2.4 Tratamiento térmico.....	138
IV.4.2.5 Sistema de tratamiento por PEAI.....	139
IV.4.2.6 Envasado y almacenamiento de las muestras.....	139
IV.4.2.7 Estabilidad microbiológica.....	139
IV.4.2.8 Determinación de las vitaminas hidrosolubles.....	140
IV.4.2.9 Condiciones para el HPLC.....	140
IV.4.2.10 Condiciones para el MS-MS.....	141

IV.4.2.11 Determinación de los péptidos inhibidores de la ECA.....	141
IV.4.3 Resultados.....	142
IV.4.3.1 Vitaminas hidrosolubles.....	142
V.4.3.1.1 Efecto de los tratamientos en las vitaminas.....	142
IV.4.3.1.2 Efecto del almacenamiento en la estabilidad de las vitaminas tratadas por PEAI o calor.....	148
IV.4.3.2 Actividad inhibidora de la ECA.....	151
IV.4.3.2.1 Efecto de los PEAI o del calor en la actividad inhibidora de la ECA.....	151
IV.4.4 Conclusiones.....	153
IV.4.5 Referencias.....	154

**CAPÍTULO 5: POTENCIAL ADAPTACIÓN DE MICROORGANISMOS
TRATADOS POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD.**

V.5.1 Introducción.....	165
V.5.2 Materiales y métodos.....	166
V.5.2.1 Preparación del cultivo de los microorganismos.....	166
V.5.2.2 Sistema de tratamiento por PEAI.....	167
V.5.2.2.1 Inoculación de muestras y muestras control.....	168
V.5.2.2.2 Tratamiento por PEAI del estudio de adaptación de <i>Lactobacillus. casei</i>	169
V.5.2.2.3 Tratamiento por PEAI del estudio de adaptación de <i>Escherichia coli</i>	169
V.5.2.3 Recuento de las células viables.....	171
V.5.2.4 Evaluación del daño subletal.....	172
V.5.2.5 Técnicas moleculares.....	172
V.5.2.6 Técnicas proteómicas.....	173

V.5.2.7 Estudio cinético y análisis de datos.....	176
V.5.3 Resultados.....	177
V.5.3.1 Estudio de daño subletal y generación de transformantes de <i>Lactobacillus casei</i>	177
V.5.3.2 Estudio de la evaluación de la posibilidad de adaptación de <i>Escherichia coli</i>	179
V.5.3.2.1 Cinéticas de inactivación.....	179
V.5.3.2.2 Estudios de transformación.....	181
V.5.3.2.3 Estudio del daño subletal.....	183
V.5.3.2.4 Estudio de proteómica.....	189
V.5.4 Conclusiones.....	197
V.5.5 Referencias.....	198
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	207
VI. CONCLUSIONES.....	225
VII. ANEJOS.....	229
VII.1 Preparación de la bebida mezcla de zumo de naranja y leche.....	231
VII.2 Publicaciones asociadas a la presente tesis doctoral.....	239
VIII. REFERENCIAS.....	245

INDICE DE FIGURAS

Figura II.1 Esquema básico eléctrico de un equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad compuesto por un generador (U_0), una serie de inductancias (L_i), una serie de condensadores (C_i), un interruptor (SW) y una resistencia (R_s).....	11
Figura II.2 Diferentes diseños de cámaras de tratamiento: (a) Placas paralelas; (b) coaxial; y (c) cofield.....	14
Figura II.3. Pulso de caída exponencial y pulso cuadrado.....	17
Figura II.4. Pulsos cuadrados bipolares.....	18
Figura II.5. Representación de curvas de supervivencia según el modelo de Hülsheger.....	35
Figura II.6. Representación de curvas de supervivencia según el modelo de Weibull en función del valor del parámetro de forma (n).....	37
Figura II.7. Equipo comercial de PEAI y sistema de cámaras co-field para tratamiento de aguas residuales desarrollado por DTI.....	42
Figura II.8. Equipos desarrollados por DTI para la Ohio State University (izq.) y la Universidad de Salerno (dcha.) capaces de tratar 5000 l/h y 400 l/h respectivamente.....	43
Figura IV.1.1. Equipo de PEAI OSU-4D en las instalaciones del IATA.....	60
Figura IV.1.2. Esquema de la disposición de las cámaras, de los termopares y del sistema de refrigeración (izq.) y detalle de los electrodos y aislante que conforman las cámaras de tratamiento tipo co-field (dcha.).....	61
Figura IV.1.3. Curvas de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> en una bebida de leche y zumo tratada a diferentes intensidades de campo eléctrico (ancho de pulso de 2.5 μ s, pulsos cuadrados bipolares). Desviación estándar expresada como barras de error.....	65
Figura IV.2.1. Curvas de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en una bebida de leche y zumo a diferentes intensidades de campo eléctrico y temperaturas de entrada (♦ 10	

°C; □ 32 °C) (ancho de pulso de 2.5 μs, pulsos cuadrados bipolares). Desviación estándar expresada como barras de error.....82

Figura IV.2.2. Curvas de supervivencia isotérmicas de *S. cerevisiae* en una bebida de leche y zumo.....84

Figura IV.2.3. Influencia de la energía aplicada y la temperatura de entrada en la inactivación de *S. cerevisiae* por PEAI en una bebida de leche y zumo.....85

Figura IV.2.4. Superficie de respuesta predichas por los modelos globales (Eq. 8 and 9) para la inactivación por PEAI de *Saccharomyces cerevisiae* a 10 °C (a) y 32 °C (b).....93

Figura IV.3.1. Curvas de inactivación de PME en una bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI (◆10kV/cm; □20 kV/cm; ▲30 kV/cm; ○40 kV/cm) a diferentes temperaturas de entrada: (a) 29 °C; (b) 36 °C; (c) 41 °C.....111

Figura IV.3.2. Comparación de las curvas de inactivación de PME a 40 kV/cm, variando la temperatura de entrada (29 °C (○); 36 °C (□); 41 °C (Δ)).....112

Figura IV.4.1. Efecto del tratamiento térmico (a. 84 °C; b. 95 °C) en el contenido vitamínico (▨ Ácido pantoténico; □ Biotina; ▩ Ácido fólico; ▤ Riboflavina). Desviación estándar expresada como barras de error.....145

Figura IV.4.2. Efecto del almacenamiento en el contenido vitamínico (▨ Ácido pantoténico; □ Biotin; ▩ Ácido Fólico; ▤ Riboflavina) de una bebida mezcla de leche y zumo de naranja tratada térmicamente (a. 84 °C 15 s; b. 84 °C 60 s; c. 84 °C 120 s.) o por PEAI (d. 40 kV/cm 130 μs; e. 15 kV/cm 700 μs.). Desviación estándar expresada como barras de error.....149

Figura IV.4.3. Efecto del tratamiento térmico en la acción inhibitoria en la ECA (● 84 °C; □95 °C). Desviación estándar expresada como barras de error.....152

Figura IV.4.4. Efecto del almacenamiento en la actividad inhibitoria en la ECA (▨ 40 kV/cm, 130 μs; ▩ 15 kV/cm, 700 μs; ▤ 84 °C 15 s; ▥ 84 °C 60 s, ▦ 84 °C 120 s) de una bebida mezcla de zumo de naranja y leche tratada por PEAI o térmicamente. Desviación estándar expresada como barras de error.....153

Figura IV.5.1 Curvas de supervivencia para <i>E. coli DH5α</i> a diferentes intensidades de campo eléctrico, 15 kV/cm (◆), 20 kV/cm (▲) y 30 kV/cm (■). Datos experimentales ajustados a la función de distribución de Weibull.....	180
Figura IV.5.2 Ratio de supervivencia y frecuencia de transformación de <i>E. coli DH5α</i> tratada por PEAI a diferentes temperaturas de entrada. El tratamiento por PEAI es de 15 kV/cm y 700 μs. Los resultados se obtienen como una media de tres experimentos y las desviaciones estándar se indican como barras de error.....	182
Figura IV.5.3 Efecto de la temperatura de entrada en la inactivación y en la proporción de células dañadas de <i>E. coli</i> suspendidas en glicerol y tratadas por PEF (15 kV/cm; 700 μs).....	184
Figura IV.5.4 Daño subletal y frecuencia de transformación de <i>E. coli DH5α</i> tratada por PEAI a diferentes temperaturas de entrada.....	187
Figura IV.5.5 Imágenes de los geles de electroforesis 2D del perfil proteico del <i>E. coli</i> control (a) y tratado por PEF (b).....	190
Figura IV.5.6 Evolución de los valores de los ratios de las proteínas de <i>E. coli</i> tras los tratamientos por PEF sin recuperación respecto al control.....	192
Figura IV.5.7 Evolución de los valores de los ratios de las proteínas de <i>E. coli</i> tras los tratamientos por PEF con recuperación respecto al control.....	194
Figura V.1 Histograma de los valores de conductividad de los productos comerciales estudiados.....	211
Figura V.2 Inactivaciones máximas de bacterias en zumo de naranja (■) y bebida zumo naranja-leche (□).....	214
Figura V.3 Etapas genéricas en la modelización matemática.....	216
Figura V.4. Curvas de inactivación de 40 kV/cm predichas por el modelo de Weibull de <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> (Sampedro y col. 2011), <i>L. plantarum</i> (Sampedro y col., 2006) y <i>S. cerevisiae</i>	218
Figura VII.1. Valores de pH, °Brix, conductividad y viscosidad de los tres productos (25, 50 y 70% en zumo de naranja).....	235

Figura VII.2. Inactivaciones de <i>E. coli</i> inoculado en los tres productos (25, 50 y 70% en zumo de naranja) en las condiciones de tratamiento estudiadas.....	236
Figura VII.3. Evolución de las temperaturas máximas alcanzadas por los tres productos (25, 50 y 70% en zumo de naranja) en las condiciones de tratamiento estudiadas.....	237

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla IV.1.1. Parámetros \pm desviación estándar de los modelos de Bigelow, Hülshager y Weibull para las curvas de supervivencia de <i>E. coli</i>	66
Tabla IV.1.2. Valores de MSE para los modelos de Bigelow, Hülshager y Weibull.....	67
Tabla IV.1.3. Parámetros \pm desviación estándar y valores de MSE del modelo simplificado de Weibull para las curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> (25 kV/cm $\leq E \leq$ 40 kV/cm).....	68
Tabla IV.2.1. Inactivación de <i>S. cerevisiae</i> (reducciones logarítmicas \pm desviación estándar) y máxima temperatura de salida alcanzada variando la intensidad de campo eléctrico y la temperatura de entrada para tiempos de tratamiento de 40 and 110 μ s.....	83
Tabla IV.2.2. Parámetros \pm desviación estándar obtenidos del ajuste de los datos de inactivación frente a Q en el modelo bifásico (Ec.IV.2.2).....	86
Tabla IV.2.3. Valores de MSE y rango de las distribuciones que mejor se ajustan proporcionadas por la herramienta “best fit” de @Risk 4.5 best fit tool (Palisade Corporation, Newfield, N.Y.) para los datos de inactivación por PEAI de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes temperaturas de entrada ((a) 10 °C; (b) 32 °C).....	88
Tabla IV.2.4. Evaluación del modelo de Weibull y efecto de la intensidad de campo eléctrico y la temperatura de entrada en el factor de forma.....	89
Tabla IV.2.5. Parámetros \pm desviación estándar y MSE de el modelo simplificado de Weibull para las curvas de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i>	91
Tabla IV.2.6. Parámetros estimados obtenidos al ajustar los modelos globales (Ec.IV.2.8 y Ec. IV.2.9) al total de los datos experimentales.....	92
Tabla IV.3.1. Condiciones de tratamiento usadas en este estudio.....	106

Tabla IV.3.2. Valores de los parámetros de los modelos de Weibull, Baranyi, y Logístico \pm desviación estándar obtenidos al ajustarse a los datos experimentales de inactivación de PME.....	114
Tabla IV.3.3 Valores de los parámetros de la regresión lineal del incremento de temperatura al variar la intensidad de campo eléctrico y temperatura de los alimentos de entrada.....	117
Tabla IV.3.4. Influencia de las variables intensidad de campo eléctrico y temperatura de entrada sobre los parámetros de los modelos de Weibull, Baranyi, y Logístico.....	118
Tabla IV.3.5. Valores de MSE y “Accuracy factor” de los modelos estudiados.....	122
Tabla IV.3.6. Parámetros estimados obtenidos al ajustar los modelos globales (Eq. 8 and 9) a la totalidad de los datos experimentales.....	123
Tabla IV.4.1. R.D.A y nivel de fortificación en la bebida.....	138
Tabla IV.4.2. Valores de los parámetros de la espectrometría de masas usados en la cuantificación de las vitaminas.....	141
Tabla IV.4.3. Condiciones de tratamiento aplicados en el estudio del comportamiento de las vitaminas hidrosolubles y de la actividad inhibidora de la ECA adicionadas a la bebida mezcla de zumo de naranja y leche.....	143
Tabla IV.4.4. Efecto del tratamiento por PEAI en el contenido de vitaminas hidrosolubles expresado como retención (C/C_0) \pm desviación estándar y actividad inhibitoria de la ECA (ACE/ACE_{100}) \pm desviación estándar.....	146
Tabla IV.5.1 Condiciones de tratamiento por PEAI para el estudio de <i>Lactobacillus casei</i>	168
Tabla IV.5.2 Condiciones de tratamiento por PEAI para el estudio de <i>Escherichia coli</i>	169
Tabla IV.5.3 Efectos de los diferentes tratamientos por PEAI en la recuperación de células de <i>Lactobacillus casei</i>	178

Tabla IV.5.4 Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar los modelos de Weibull (a) y de Hülshager (b) a los datos experimentales.....	181
Tabla IV.5.5 Valores de los ratios de las proteínas de <i>E. coli</i> tras los tratamientos por PEF sin recuperación respecto al control.....	191
Tabla IV.5.6 Valores de los ratios de las proteínas de <i>E. coli</i> tras los tratamientos por PEF con recuperación respecto al control.....	193
Tabla IV.5.7 Valores de los ratios de las proteínas de <i>E. coli</i> tras los tratamientos por PEF a 25°C con recuperación respecto al control.....	194
Tabla IV.5.8 Valores de los ratios de las proteínas de <i>E. coli</i> tras los tratamientos por PEF a 45°C con recuperación respecto al control.....	195
Tabla V.1 Microorganismos, tratamientos y referencias bibliográficas usadas en la figura V.2.....	214
Tabla V.2 Valores del factor de escala de Weibull de diferentes microorganismos tratados por PEAI en zumo de naranja-leche a 40kV/cm.....	217
Tabla VII.1. Propiedades fisico-químicas de los productos comerciales analizados en este estudio.....	233

ABREVIATURAS

a : Factor de escala del modelo de Weibull (μs).

A_r : Área del electrodo (m^2).

A : Actividad enzimática (PME) de la muestra tratada (U/ml).

A_o : Actividad enzimática (PME) de la muestra control (U/ml).

A_f : Accuracy factor.

$b(e)$ y $b(t)$: coeficientes de regresión del modelo de Hülshager.

b_I : maximum specific death rate ($1/\mu\text{s}$).

$B(t)$: Función de la fase lag del modelo de Baranyi.

D : Tiempo de reducción decimal.

D_{min} : Tiempo de reducción decimal mínimo del modelo de Baranyi (μs).

Λ : Pendiente máxima del modelo Log-logístico.

E : Intensidad de campo eléctrico (kV/cm).

E_c : Intensidad de campo eléctrico crítico (kV/cm).

k_e : Pendiente de la curva de supervivencia en V_c del modelo de Fermi.

k_{max} : Índice de máxima destrucción del modelo de Baranyi.

MSE : Error Cuadrático Medio.

n : Factor de forma del modelo de Weibull.

N : Concentración de microorganismos tras el tratamiento (ufc/ml).

N_0 : Concentración de microorganismos antes del tratamiento (ufc/ml).

N_{NaOH} : Normalidad del NaOH (N).

Np : número de pulsos.

$PEAI$: Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad.

Q : Energía del tratamiento por PEAI (V/m).

q_b : Indicador de la presencia de colas en las curvas de supervivencia del modelo de Baranyi.

Q_p : Energía aplicada por pulso (J).

r : Tiempo necesario para alcanzar la mitad de k_{max} del modelo de Baranyi (μs).

- R : Resistencia eléctrica de las cámaras de tratamiento (Ω).
- RA : Actividad enzimática (PME) residual de la muestra tratada.
- ρ : Resistividad del medio ($\Omega \cdot m$).
- σ : Conductividad eléctrica del alimento (S/m).
- S : Fracción de supervivientes.
- t : Tiempo de tratamiento (μs).
- T_o : Temperatura de entrada ($^{\circ}C$).
- t_{cH} : Tiempo de tratamiento crítico del modelo de Hülshager (μs).
- t_{cw} : Tiempo crítico del modelo de Weibull (μs).
- t_l : shoulder parameter of Logistic model (μs).
- t_r : Tiempo de reacción de la PME (s).
- t_s : Tiempo requerido para alcanzar Λ (modelo Log-logístico).
- τ : ancho de pulso (μs).
- v : Diferencia de potencial entre los electrodos (V).
- V : Volumen de NaOH usado en la reacción de la PME (l).
- V_c : Valor crítico de E en que se alcanza un 50% de inactivación (Ecuación de Fermi).
- V_s : Volumen de muestra usado en la reacción de la PME (l).

RESÚMENES

RESUMEN

Los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI) es una tecnología no térmica de conservación de alimentos que se está siendo evaluada como alternativa a las tecnologías convencionales de conservación basadas en el calor. Esta tecnología se caracteriza por permitir obtener un producto seguro microbiológicamente, con un mayor respeto de los componentes nutricionales que el tratamiento térmico convencional.

Los trabajos que componen la presente tesis doctoral tratan de evaluar la idoneidad de la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI) en el tratamiento de un alimento ácido de la complejidad de una bebida mezcla de zumo de naranja y leche estabilizada mediante la adición de pectina. Para ello se han llevado a cabo estudios cinéticos de inactivación por PEAJ de microorganismos, tanto patógenos como alteradores, presentes en este tipo de alimento (*E. coli* y *S. cerevisiae*) y de destrucción de enzimas causantes de la pérdida de calidad (Pectín Metilesterasa, PME), obteniéndose modelos matemáticos experimentales que relacionan la intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la temperatura con la inactivación obtenida. De igual modo se evaluó el efecto de los PEAJ en el contenido de compuestos nutritivos (Vitaminas hidrosolubles y péptidos inhibidores de la ECA).

Por último se llevaron a cabo estudios preliminares de validación de la tecnología desde el punto de vista de la seguridad alimentaria a través de estudios de daño subletal, de posibilidad de generación de transformantes y de variación del perfil proteico en *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei*.

RESUM

Els Polsos Elèctrics d'Alta Intensitat (PEAI) és una tecnologia no tèrmica de conservació d'aliments que s'està avaluant com alternativa de les tecnologies convencionals de conservació basades en l'aplicació de calor. Aquesta tecnologia es caracteritza per permetre obtenir un producte segur microbiològicament, amb un major respecte dels components nutricionals que el tractament tèrmic convencional

Els treballs que componen la present tesi doctoral tracten d'avaluar la idoneïtat de la tecnologia dels Polsos Elèctrics d'Alta Intensitat (PEAI) en el tractament d'un aliment àcid de la complexitat d'una beguda barreja de suc de taronja i llet estabilitzada mitjançant l'addició de pectina. Amb aquesta finalitat s'han dut a terme estudis cinètics d'inactivació per PEAi de microorganismes, tant patògens com alteradors, presents en aquest tipus d'aliment (*E. coli* i *S. cerevisiae*) i de destrucció d'enzims causants de la pèrdua de qualitat (Pectín Metilesterasa, PME), obtenint-se models matemàtics experimentals que relacionen la intensitat de camp elèctric, el temps de tractament i la temperatura amb la inactivació obtinguda. D'igual manera es va avaluar l'efecte dels PEAi en el contingut de compostos nutritius (Vitamines hidrosolubles i pèptids inhibidors de la ECA).

Finalment es van dur a terme estudis preliminars de validació de la tecnologia des del punt de vista de la seguretat alimentària a través d'estudis de dany subletal, de possibilitat de generació de transformants i de variació del perfil proteic en *Escherichia coli* i *Lactobacillus casei*.

ABSTRACT

Pulsed Electric Fields (PEF) is a non-thermal food preservation technology that is being evaluated as an alternative for conventional preservation processes based on heat. This technology is characterized by allowing obtain a microbiologically safe product with greater respect for the nutritional components than the conventional heat treatment.

The studies that comprise this doctoral thesis try to assess the suitability of PEF technology to deal an acidic food of the complexity of a mixed orange juice and milk beverage stabilized by pectin addition. This has been carried out by PEF inactivation kinetic studies of spoilage and pathogenic microorganisms present in this kind of food (*Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*) and destruction of enzymes that cause the loss of quality (Pectin methylesterase, PME), obtaining experimental mathematical models that relates the electric field intensity, the treatment time and temperature with the inactivation obtained. Similarly, the effect of the PEF on nutritional compounds content (water-soluble vitamins and ACE inhibitory peptides) was evaluated.

Finally, were conducted preliminary studies of technology validation from the point of view of food safety through studies of sublethal damage, possibility of generating transformants and variation of protein profile in *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei*

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

La existencia de consumidores más informados y exigentes con los productos que adquieren, demandando alimentos frescos, saludables, seguros y listos para tomar, se ha incrementado en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud recomienda al menos 5 raciones de frutas y verduras al día, una práctica muy saludable, pero poco puesta en práctica debido a un creciente ritmo de vida que ha dejado extintas prácticas gastronómicas tradicionales. Este hecho ha obligado tanto a la industria como a la comunidad científica, a llevar a cabo un proceso de evolución continua con respecto al procesado de alimentos. Los procesos de conservación tradicionales se han basado en el efecto de la temperatura, la reducción de la actividad de agua o del pH, y la adición de conservantes, como medidas para garantizar la estabilidad del producto tratado a lo largo del tiempo y reducir/evitar la proliferación microbiana. La implantación generalizada de estos procesos radica principalmente en su bajo coste, y efectividad demostrada, siendo el tratamiento térmico el más utilizado en la conservación de alimentos. Sin embargo, la falta de uniformidad en los tratamientos, y los cambios negativos producidos en las propiedades físico-químicas y nutricionales de los alimentos procesados térmicamente son los principales obstáculos a superar para satisfacer a los consumidores. Para conseguirlo, se superan diariamente mediante investigación y marketing, inconvenientes atribuidos a procesos convencionales, ofertando productos mínimamente procesados y a la vez altamente nutritivos.

La innovación en procesos de conservación está derivando hacia el desarrollo de tratamientos específicos, según el alimento, que maximicen el equilibrio en la balanza CALIDAD–SEGURIDAD, produciendo alimentos mínimamente procesados, nutritivos, atractivos organolépticamente, y seguros durante largos periodos de tiempo. Esta búsqueda de alternativas a los procesos convencionales de conservación contempla 3 líneas de actuación; (i) por una parte, la optimización de los tratamientos térmicos tradicionales, principalmente mediante la disminución de la intensidad del tratamiento acompañado de un almacenamiento en frío; (ii) en

segundo lugar, la aplicación de procesos basados en la combinación de tecnologías a baja intensidad- concepto de tecnología de barreras; (iii) y finalmente, el desarrollo de tecnologías emergentes de conservación donde la temperatura no es el principal factor que produce la estabilización del alimento. Una de las tecnologías emergentes de conservación de alimentos más prometedoras desde el punto de vista de la posible implantación a nivel industrial, son los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI). Las aplicaciones más importantes de esta tecnología han sido la pasteurización de alimentos líquidos, principalmente leche y zumos de frutas, y el efecto de la tecnología en los procesos de transferencia de masas, como el secado y la extracción de compuestos.

Los parámetros tecnológicos que definen un tratamiento por PEAJ son principalmente la intensidad de campo eléctrico (E) y el tiempo de tratamiento (t). Sin embargo, la efectividad de una tecnología se ve influenciada también por factores ambientales. Se denomina factor ambiental, a cualquier característica o propiedad del alimento que pueda influir en la efectividad de un tratamiento. Para evaluar objetivamente el efecto de las operaciones de procesado sobre la seguridad microbiológica de los alimentos, es necesario cuantificar el comportamiento microbiano mediante modelos matemáticos que nos permitan determinar la respuesta de estos microorganismos a las diversas condiciones en estudio (de proceso y ambientales). Las cinéticas de inactivación constituyen una etapa básica en la determinación de los microorganismos de referencia para una tecnología y un producto. Son numerosos los estudios que recogen cinéticas de primer orden, relación tiempo de tratamiento frente a inactivación, como respuesta de diversos microorganismos al tratamiento por PEAJ, en muy variados alimentos y medios de referencia. Sin embargo, hay una carencia de estudios que expliquen el efecto de los factores ambientales en las cinéticas de inactivación, y más concretamente, el efecto de la temperatura.

Aunque el uso de las tecnologías no térmicas proporciona una serie de ventajas desde el punto de vista nutricional y de calidad del alimento frente a las tecnologías térmicas convencionales, es necesario tener en cuenta los posibles **riesgos microbiológicos** asociados a su uso. Se considera que el incremento de la permeabilidad celular es el principal factor en la inactivación de microorganismos por PEAI. Esta permeabilización se puede revertir, siempre y cuando el daño infligido a la célula no sea demasiado grande. Aunque las bacterias vegetativas a veces pueden sobrevivir en tales condiciones, a menudo son dañadas subletalmente. Sea cual sea la proporción de células dañadas, éstas pueden volver al estado normal, en condiciones adecuadas, al repararse el daño celular sufrido. Por lo tanto, las capacidades originales de la célula se recuperarán tras un periodo de reanimación en ausencia de los agentes inhibidores. Sin embargo, debido a la presencia en el medio de material genético provenientes de células muertas, o a la variación del perfil proteico de las células supervivientes, puede haber una resistencia posterior a la inactivación por agentes que normalmente son inhibidores, un cambio en la virulencia de un patógeno o una adquisición de nuevas características. Todo ello obliga a la evaluación de los riesgos potenciales que implica el uso de la técnica de los PEAI.

Por todo ello, la presente tesis doctoral trata de cuantificar mediante modelos matemáticos la influencia de los factores de proceso (E , t) y ambientales (temperatura) más importantes en la inactivación tanto de microorganismos como de enzimas y en la degradación de determinados parámetros nutritivos. Del mismo modo, se realiza una primera aproximación al efecto de la tecnología sobre la formación de células de microorganismos subletalmente dañadas y la posibilidad de las mismas para dar lugar a la formación de electrotransformantes y/o modificaciones proteicas que puedan conllevar cambios de virulencia o adquisición de nuevas características y que supongan por tanto un riesgo microbiológico.

ANTECEDENTES

II.1 TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS.

La innovación tecnológica en la industria alimentaria ha proporcionado las herramientas necesarias para satisfacer las demandas del consumidor de alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, con una elevada calidad y disponibilidad nutricional. Las principales líneas de investigación en conservación de alimentos serían: 1) mejora del tratamiento térmico, tanto de aplicación directa (HTST o LTLT+envasado aséptico) como indirecta de calor (microondas, calentamiento óhmico, infrarrojos, entre otras); 2) desarrollo de la tecnología del envasado (envasado en atmósferas modificadas y envasado activo); 3) Aplicación de antimicrobianos; 4) desarrollo de tecnologías no térmicas.

Tradicionalmente, la mayoría de alimentos conservados son procesados térmicamente sometiendo al alimento a temperaturas entre 60° y 100°C durante pocos segundos. Durante este período, se transfiere una gran cantidad de energía al alimento. Esta energía puede provocar reacciones indeseables en el alimento, acarreando cambios no deseados o formación de subproductos. Se definen tecnologías no térmicas de conservación de alimentos aquellas que la aplicación del calor no es el principal factor que produce la estabilización del alimento. La ventaja que presentan estas tecnologías frente a las térmicas es su menor impacto en la calidad del alimento. Las tecnologías no térmicas en estado de desarrollo más avanzado son: altas presiones hidrostáticas, irradiación, pulsos eléctricos de alta intensidad, pulsos lumínicos, radiación por ultravioleta y ultrasonidos. No todas están en la misma fase de desarrollo, siendo las altas presiones y la irradiación las tecnologías más usadas en productos comerciales.

Cada una de las tecnologías no térmicas tiene aplicaciones específicas en términos de los tipos de alimentos que pueden ser procesados. Por ejemplo, la alta presión, los campos magnéticos oscilantes, los antimicrobianos, los pulsos lumínicos y la tecnología de barreras se pueden utilizar tanto en alimentos líquidos

como sólidos, mientras que los pulsos eléctricos de alta intensidad es más fácil aplicarlos en alimentos líquidos y la irradiación es eficaz para alimentos sólidos. Asimismo, los pulsos lumínicos son más eficaces para la pasteurización de superficies. Además, los pulsos lumínicos, la irradiación, los campos magnéticos y las altas presiones hidrostáticas se pueden utilizar para procesar alimentos preenvasados, reduciendo el riesgo de contaminación por contacto o postprocesado. Por tanto, las tecnologías no térmicas no se pueden aplicar al procesado de toda clase de alimentos. Cada tecnología no térmica posee sus ventajas y limitaciones. En algunos casos, por ejemplo, en la inactivación de esporas, es necesario utilizar un planteamiento de métodos combinados.

Entre todas las tecnologías emergentes no térmicas, los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) es una de las tecnologías más atractivas debido a su corto tiempo de tratamiento y reducción de los efectos de calentamiento con respecto a otras tecnologías. La tecnología de los PEAJ permite la inactivación de células vegetativas de bacterias y levaduras en diversos alimentos. Debido a que se ha comprobado la resistencia de las esporas bacterianas a los PEAJ, las aplicaciones de esta tecnología se centran principalmente en microorganismos patógenos y alteradores, especialmente en alimentos ácidos.

La mayoría de las técnicas de conservación de alimentos están basadas en el retraso o prevención del crecimiento microbiano, utilizando factores que más influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. La utilización de una combinación de factores de inhibición puede presentar ventajas principalmente porque permite el uso menos extremo de un único tratamiento. Los PEAJ se pueden considerar como una barrera que combinada con factores adicionales, tales como el pH, fuerza iónica, temperatura y agentes antimicrobianos, se puede utilizar de forma efectiva en la conservación de alimentos.

II.2 PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD.

II.2.1 Aspectos tecnológicos.

El procesado por PEAI consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de corta duración (1- 10 μ s) e intensidades de campo altas (15-40 kV/cm) a alimentos situados entre dos electrodos uno de los cuales está conectado a tierra y el otro a una tensión alta, produciéndose un campo eléctrico en el espacio comprendido entre ellos. Básicamente, un equipo de PEAI consta de un generador de pulsos, una cámara de tratamiento, un sistema de impulsión del alimento y equipos de control del tratamiento. A su vez, el generador de pulsos está compuesto por tres secciones: generación de corriente continua al voltaje requerido a través de un generador de energía, almacenamiento de energía eléctrica mediante uno o varios condensadores y unos componentes que libera la energía en forma de pulso con las características deseadas mediante una combinación de condensadores, resistencias e interruptores, llamada "Pulse-Forming Network (PFN)" (Figura II.1).

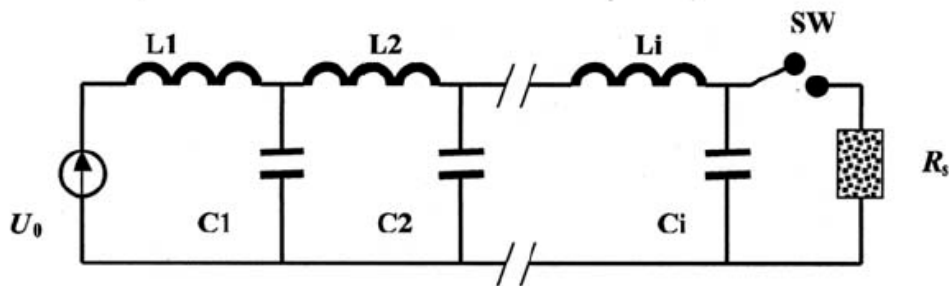


Figura II.1 Esquema básico eléctrico de un equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad compuesto por un generador (U_0), una serie de inductancias (L_i), una serie de condensadores (C_i), un interruptor (SW) y una resistencia (R_s).

GENERADOR DE ENERGÍA

El generador de energía es el encargado de suministrar la energía eléctrica (W) a un voltaje seleccionado (U_0). Para ello transforma la corriente alterna de la red en

corriente continua con la que se carga el condensador. Los parámetros que caracterizan al generador son la intensidad de la corriente eléctrica producida y la máxima diferencia de potencial a la que es capaz de cargar el condensador. La diferencia de potencial junto con la resistencia de la cámara de tratamiento, determinan la intensidad máxima del campo eléctrico que es posible alcanzar.

SERIE DE CONDENSADORES, INDUCTANCIAS Y RESISTENCIAS

Los condensadores colocados en paralelo son los componentes encargados de almacenar la energía eléctrica (W) que se va a descargar a través del interruptor. Las características más importantes del condensador son la diferencia de potencial máxima de trabajo y su capacidad de almacenamiento. Los inductores son los componentes encargados de almacenar temporalmente la energía magnética mientras que las resistencias son los encargados de disipar la energía, siendo principalmente las cámaras de tratamiento. Dependiendo del tipo de pulso, el esquema eléctrico o PFN que lo genera es diferente (Figura II.1), siendo el PFN de los pulsos cuadrados bipolares el más complejo (De Haan y Willcock, 2002).

INTERRUPTORES

Los interruptores son los componentes encargados de comunicar la energía a los electrodos que configuran la cámara de tratamiento. Las principales características que definen un interruptor son su velocidad de apertura y de cierre, la máxima intensidad de corriente que puede atravesarlo, el máximo voltaje al que puede trabajar y la frecuencia a la que pueden aplicarse los pulsos. Además controla la frecuencia, la duración y forma del pulso. El interruptor debe resistir el máximo voltaje presente en los condensadores así como transferir una corriente eléctrica con una intensidad de corriente I_{max} debida a la resistividad que presenta el alimento.

CÁMARAS DE TRATAMIENTO

Constan de dos electrodos, uno conectado al condensador a través del interruptor y el otro conectado a tierra, separados por un aislante (1-50mm), formando un recinto donde se sitúa el alimento. El diseño de los diferentes componentes de la cámara es fundamental para el diseño del resto del equipo y es un parámetro importante en la inactivación microbiana, debiendo tener ciertas especificaciones:

1. La cámara de tratamiento debe soportar intensidades de corrientes altas.
2. La distribución del campo eléctrico en la cámara debe ser lo más uniforme posible.
3. No debe haber zonas del alimento sin que reciba tratamiento.
4. Debe evitarse en lo posible la ruptura dieléctrica ya que provoca una no uniformidad del tratamiento y un sobrecalentamiento del alimento. La ruptura puede producirse por un incremento del campo localizado en un electrodo o por la presencia de burbujas de gas en el alimento.
5. Los materiales deben minimizar fenómenos electroquímicos en los electrodos.

Uno de los factores a tener en cuenta en las cámaras de tratamiento es el material tanto de los electrodos como del aislante. Estos materiales no deben interaccionar con el alimento y deben poder limpiarse y esterilizarse (Zhang y col., 1995). Se consideran al acero inoxidable, al titanio y al grafito como los materiales más adecuados para los electrodos, y las cerámicas o los polímeros plásticos para el aislante. El tratamiento por PEAI produce una migración de iones de los electrodos hacia el alimento (Evrendilek y col., 2004; Roodenburg y col., 2005 (a y b)). Roodenburg y col., (2005b) observaron, que a pesar de realizar varios tratamientos en la misma muestra de zumo de naranja, las concentraciones de metales migrados al zumo eran muy inferiores a la concentración máxima permitida para zumos de frutas y agua potable. La migración de metales de los electrodos al alimento

depende tanto del material y forma del electrodo, como del tipo y características del producto a tratar.

Según el régimen de trabajo, las cámaras pueden aplicar tratamientos estáticos o continuos, siendo estas últimas las más indicadas para equipos de conservación de alimentos.

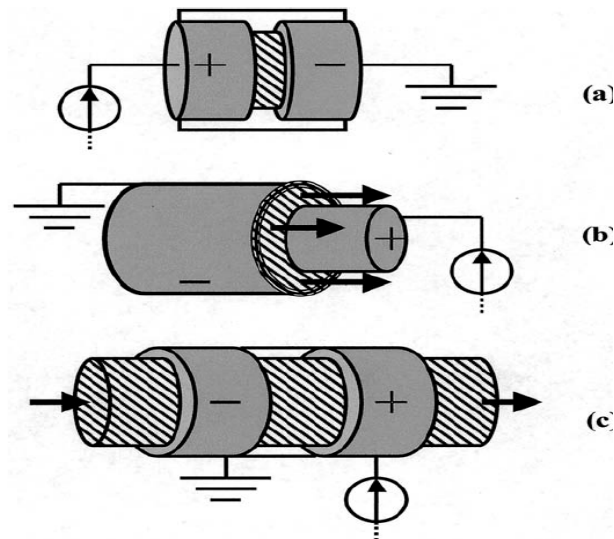


Figura II.2 Diferentes diseños de cámaras de tratamiento: (a) Placas paralelas; (b) coaxial; y (c) cofield.

Los diseños de cámaras de tratamiento más usuales son: placas paralelas, cilindros coaxiales y cámaras co-field (Figura II.2) (Barbosa-Cánovas y col., (1999)). Las cámaras de placas paralelas se usan principalmente en equipos de tratamiento no continuos. Se caracterizan principalmente porque genera intensidades de campo uniformes en toda la cámara. En las cámaras coaxiales, el alimento fluye entre dos electrodos cilíndricos situados concéntricamente. Debido a su geometría, la intensidad de campo no es uniforme en el espacio situado entre ambos electrodos. Las cámaras del tipo cofield se caracterizan porque el alimento fluye a través de un tubo formado por dos electrodos perforados conectados por un tubo de aislante, de modo que el alimento fluye en el mismo sentido que las líneas

de campo eléctrico originado. Sin embargo, tanto las cámaras colineales (co-field) y coaxiales, aunque pueden presentar problemas de uniformidad del campo, son más adecuadas para el tratamiento del alimento en continuo.

Una estrategia utilizada en los equipos a escala piloto para aumentar la efectividad del tratamiento en sistemas en continuo ha sido la colocación de cámaras de tratamiento en serie con refrigeración entre ellas para controlar la temperatura.

SISTEMA DE REGISTRO DE DATOS.

El equipo debe de disponer de un sistema que registre los parámetros del proceso tales como la forma del pulso, el número de pulsos, el voltaje aplicado, la intensidad de corriente que circula a través de la cámara de tratamiento, la temperatura de tratamiento y el caudal del producto a tratar en el caso de un proceso en continuo.

Para el registro de los parámetros eléctricos las sondas se conectan a un osciloscopio, que se usa principalmente para comprobar los valores reales de dichos parámetros.

II.2.2 Factores determinan la inactivación por PEAI.

Los estudios realizados de inactivación de microorganismos y enzimas por PEAI han mostrado que el nivel de inactivación conseguido depende de una serie de parámetros propios de la tecnología, de la naturaleza del producto a tratar y del enzima o microorganismo de referencia.

II.2.2.1 Factores técnicos.

INTENSIDAD DE CAMPO ELÉCTRICO

La intensidad del campo eléctrico aplicada (E) se define como el cociente de la diferencia de potencial existente entre dos electrodos y la distancia entre los mismos:

$$E = \frac{V}{d} \quad (\text{Ec.II.1a})$$

siendo E la intensidad de campo eléctrico (V/m); V , la diferencia de potencial (V); y d , la distancia entre los electrodos (m).

Sin embargo, el cálculo de la intensidad de campo depende del tipo de cámara de tratamiento, siendo la ecuación II.1a válida para cámaras de placas paralelas. Para cámaras del tipo colineal o coaxial, donde los electrodos no están paralelos, el cálculo de la intensidad del campo eléctrico es más complejo. En el caso de las cámaras coaxiales, la intensidad se determinaría mediante la siguiente ecuación:

$$E = \frac{V}{r \cdot \ln(R_2/R_1)} \quad (\text{Ec.II.1b})$$

donde E es la intensidad de campo eléctrico, V es el voltaje aplicado, r es el radio del punto donde se determina el campo eléctrico, R_1 y R_2 son los radios de las superficies de los electrodos.

Numerosos estudios han mostrado que al aumentar la intensidad de campo aumenta la inactivación microbiológica o enzimática, observando algunos autores, un incremento exponencial de la inactivación para un mismo tiempo de tratamiento (Grahl y Markl, 1996; Hülshager y col., 1981; Pothakamury y col., 1996; Qin y col. 1995). Sin embargo, también se ha observado la necesidad de exceder de un valor de intensidad de campo (intensidad de campo crítica (E_c)) para obtener inactivaciones significativas. Este valor está comprendido entre 4 y 14 kV/cm, depende de la geometría de la cámara de tratamiento, del tipo de pulso, del medio de tratamiento y del microorganismo, especialmente su tamaño y forma (Castro y col., 1993). Algunos autores sugieren la existencia de una intensidad de campo máximo a partir del cual un aumento de éste no implica un aumento significativo de la inactivación.

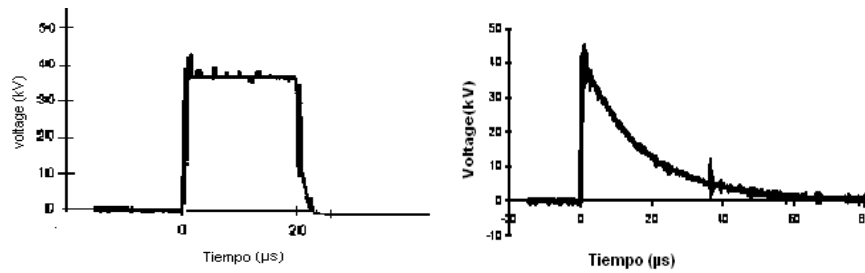


Figura II.3. Pulso de caída exponencial y pulso cuadrado.

FORMA DE PULSO

Los tipos de forma más habituales de los pulsos son los pulsos cuadrados y los de caída exponencial (figura II.3). El tipo de pulso depende de la configuración de los condensadores, de las resistencias y del tipo de interruptores.

El pulso del tipo de caída exponencial alcanza rápidamente el potencial máximo disminuyendo gradualmente hasta alcanzar un potencial igual a 0. En el caso de los pulsos de onda cuadrada, al inicio se incrementa rápidamente el potencial hasta el voltaje de trabajo, manteniéndose dicho potencial durante un periodo de tiempo, para a continuación disminuir rápidamente hasta un potencial 0.

Los pulsos de caída exponencial presentan una desventaja frente a los pulsos cuadrados. Mientras que estos últimos toda la energía utilizada se aplica al máximo voltaje de trabajo, en los de caída exponencial, una vez alcanzado el máximo voltaje, éste va disminuyendo paulatinamente, por lo que parte de la energía eléctrica no tiene efectos beneficiosos, contribuyendo solo a calentar al alimento. Esta menor exposición del producto al máximo voltaje en los pulsos de caída exponencial se refleja en una menor eficacia en la inactivación microbiológica (Amiali y col., 2006; Jeyamkondan y col., 1999; Pothakamury y col., 1996; Qin y col., 1994; Zhang y col., 1994a).

Tanto los pulsos cuadrados como los de caída exponencial pueden ser monopolares, si todos los pulsos son del mismo signo, o bipolares, si los pulsos cambian alternativamente de signo (Figura II.4). El cambio de polaridad del pulso

provoca un cambio en la orientación de las moléculas cargadas de la célula (Ho y col., 1995; Qin y col., 1994) y por tanto un estrés mayor en la membrana plasmática. La aplicación de ondas bipolares produce una mayor inactivación (Ho y col. 1995; Qin y col. 1994; Zhang y col. 1995) y minimizan la acumulación en los electrodos de componentes del medio de tratamiento. El depósito de impurezas produce una falta de heterogeneidad del tratamiento en toda la cámara, facilitándose la ruptura dieléctrica del alimento a valores de intensidades de campo inferiores a las calculadas teóricamente. Sin embargo, como desventaja, las ondas bipolares requieren de generadores de pulsos más complejos y costosos (Zhang y col. 1995).

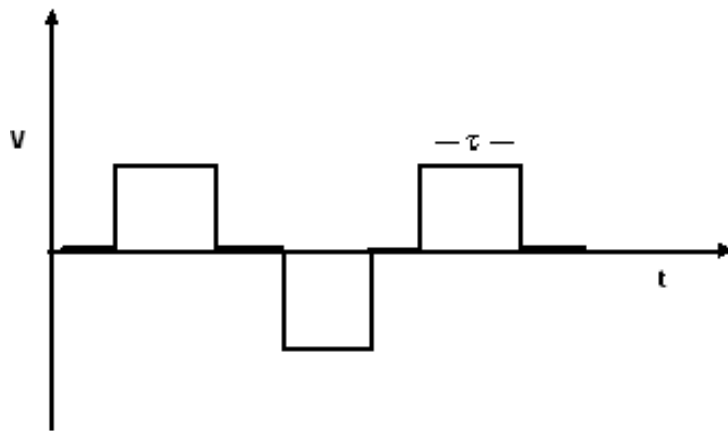


Figura II.4. Pulsos cuadrados bipolares.

Un caso especial de los pulsos bipolares, son los pulsos del tipo “instant-charge-reversal”. Este tipo de pulsos se diferencian de los bipolares en la ausencia de un “tiempo de relajación” entre los pulsos de diferente carga. Los resultados no son concluyentes respecto a su efectividad frente a otros tipos de pulsos.

ANCHURA DE PULSO

Dependiendo del tipo de onda del pulso, la complejidad del cálculo de la anchura del pulso es diferente. En el caso de los pulsos cuadrados, la anchura del pulso corresponde con la duración del pulso. Sin embargo, en los pulsos de la caída exponencial, al variar el voltaje con la duración del pulso, se define la anchura del pulso como el tiempo durante el cual el voltaje es superior al 37% del valor máximo alcanzado en la descarga (Zhang y col., 1995). Además en este tipo de pulsos, la anchura del pulso es dependiente de la resistencia de la cámara de tratamiento, dificultando el cálculo del tiempo total de tratamiento.

El efecto del ancho del pulso en la inactivación microbiológica no está claro. Algunos autores observaron un aumento de la inactivación microbiológica (Abram y col., 2003; Aronsson y col., 2001; Wouters y col. 1999) y enzimática (Elez Martínez y col., 2003a y b; Giner y col., 2001 y 2002; Marsellés-Fontanet y Martín-Belloso, 2007) al aumentar el ancho del pulso, observando además que este efecto disminuía al aumentar la intensidad de campo eléctrico (Wouters y col., 1999). Sin embargo otros autores (Mañas y col. 2001; Raso y col., 2000; Sampedro y col., 2006) observan que la inactivación es independiente de la anchura del pulso. Estas discrepancias pueden ser debidas al uso por parte de los diferentes grupos de trabajo de diferentes tipos de pulsos y cámaras de tratamiento.

Por otra parte, aunque no es concluyente el efecto del cambio del ancho del pulso en los microorganismos, la aplicación de pulsos con un ancho menor evitan el calentamiento excesivo de la muestra y reducen el posible paso de material del electrodo al medio de tratamiento o la posible formación de compuestos químicos tóxicos (Lubicki y Jayaram, 1997; Mizumo y Hori, 1988; Sale y Hamilton, 1967, 1968).

TIEMPO DE TRATAMIENTO

El tiempo de tratamiento (t) se calcula mediante el producto del número de pulsos aplicados (n) por la anchura de cada pulso (τ):

$$t = n\tau \quad (\text{Ec. II.2})$$

Está ampliamente comprobado que un aumento del tiempo de tratamiento implica un aumento de la inactivación microbiana y enzimática. Sin embargo este aumento de la inactivación no es constante. Existen numerosos estudios que muestran presencias de hombros (tiempos de tratamiento en los cuales no se producen inactivaciones significativas) y/o colas (tiempos de tratamiento a partir de los cuales un aumento del mismo no produce un aumento significativo de la inactivación) en las curvas de inactivación por PEAI de microorganismos o enzimas (Rodrigo y col. 2001, 2003 (a,b,c); Sampedro y col. 2006a)

ENERGÍA DEL PULSO

Un parámetro a tener en cuenta en todo proceso industrial es la energía consumida durante dicho proceso.

En la tecnología de los PEAI, la energía eléctrica teórica aplicada por pulso (Q) (J) se puede calcular a partir de las siguientes ecuaciones dependiendo de la forma del pulso:

$$\text{Onda de caída exponencial} \quad Q = \frac{1}{2} \frac{V^2 \tau}{R} \quad (\text{Ec. II.3})$$

$$\text{Onda cuadrada} \quad Q = \frac{V^2 \tau}{R} \quad (\text{Ec. II.4})$$

siendo V la diferencia de potencial entre los electrodos (V), τ la amplitud de pulso (s) y R la resistencia que ofrece la cámara de tratamiento al paso de la corriente. Por tanto, la energía eléctrica total aplicada durante un tratamiento de PEAI es igual a la energía del pulso multiplicado por el número de pulsos.

La resistencia de la cámara es directamente proporcional a la resistividad del medio de tratamiento y a la distancia entre electrodos, e inversamente proporcional al área de los mismos:

$$R = \frac{\rho d}{A} \quad (\text{Ec. II.5})$$

siendo R la resistencia de la cámara de tratamiento (Ω), ρ la resistividad del medio (Ωm), d la distancia entre electrodos (m) y A el área del electrodo (m^2). Teniendo en cuenta que la resistividad es el valor inverso de la conductividad eléctrica (σ), Abram y col. (2003), Min y col. (2003a) y Pérez y Pilosof (2004), propusieron la siguiente ecuación para el cálculo de la energía total teórica aplicada sobre el producto tras ser sometido a un tratamiento por PEAI:

$$\text{Onda cuadrada} \quad Q = E^2 \sigma t \quad (\text{Ec. II.6})$$

donde Q es la energía (J/L), E la intensidad de campo eléctrico (V/m), σ la conductividad del alimento (S/m) y t el tiempo de tratamiento (s). Al depender la conductividad eléctrica del alimento de la temperatura (Zhang y col., 1994b), si durante el tratamiento varía la temperatura, se hace necesario considerar la influencia que ejerce la temperatura en la conductividad, y por tanto en la energía consumida debida al tratamiento.

Schoenbach y col. (1997) y Heinz y col. (1999, 2002) han observado que la energía necesaria para obtener un mismo nivel de inactivación de *E. coli* y *B. subtilis* es menor al aumentar la intensidad de campo y al disminuir la amplitud del pulso.

TEMPERATURA

La aplicación de cualquier tratamiento por PEAI genera un calentamiento que se transfiere al medio o alimento, incrementándose su temperatura. A esta temperatura se le llama “temperatura máxima de tratamiento” o “temperatura de salida”. Se ha comprobado ampliamente la capacidad de la tecnología en inactivar microorganismos a temperaturas no letales. Sin embargo, si para un mismo

tratamiento (igual intensidad y tiempo de tratamiento), se aumenta la temperatura del medio y por tanto la temperatura final tras el tratamiento, se incrementa la inactivación (Jayaram y col. 1992; Jeantet y col. 1999; Pothakamury y col. 1996; Wouters y col. 1999). Múltiples estudios han observado un efecto sinérgico de la temperatura con los PEAI en la inactivación de microorganismos y de enzimas (Álvarez y col., 2006; Amiali y col., 2007; Dunn y Pearlman 1987; Hülshager y col. 1981; Jayaram y col. 1992; Rodrigo y col. 2002; Sampedro y col. 2006a; Van Loey y col. 2002). Este aumento de la inactivación puede ser debido a un aumento de la fluidez de los fosfolípidos de la membrana plasmática, facilitándose la formación de poros.

II.2.2.2 Factores biológicos

La resistencia de los microorganismos al tratamiento depende en gran medida de las características intrínsecas de los microorganismos (tamaño y forma de las células) y de su estado fisiológico. A pesar de que se han llevado a cabo numerosos estudios (Álvarez y col. 2000; Hülshager y col. 1981; Pothakamury y col. 1996; Qin y col. 1995; Sale y Hamilton 1967; Wouters y col. 1999; Zhang y col. 1995), los resultados son contradictorios tanto del efecto del tamaño y forma de la célula como de su estado fisiológico.

RESISTENCIA INTRÍNSECA DE LOS MICROORGANISMOS

La inactivación microbiológica por PEAI depende del tipo de microorganismo, la especie y la cepa (Wouters y col., 1999). En general, como en el caso del tratamiento térmico, se considera que las células vegetativas son más sensibles que las esporas bacterianas y las ascosporas (Grahl y Markl, 1996; Heesch y col., 2000; Katsuki y col., 2000; Pagán y col., 1998; Raso y col., 1998). Las bacterias son más resistentes que las levaduras, siendo las Gram-positivas más resistentes que las Gram-negativas (Hülshager y col. 1981; Qin y col. 1995; Sale y Hamilton, 1967;

Wouters y Smelt, 1997). Dentro de una misma especie microbiana, pueden existir variaciones en la resistencia a los PEAI entre cepas (Cebrián, 2009; Lado y Yousef, 2003; Rodríguez-Calleja y col., 2006; Somolinos y col., 2008). Debido a la incapacidad de la tecnología de los PEAI para inactivar por sí mismas esporas bacterianas (Heesch y col., 2000; Katsuki y col., 2000), la aplicación de los PEAI debería enfocarse, en un principio, a una sustitución de los tratamientos térmicos de pasteurización.

Hay estudios contradictorios sobre el efecto del tamaño de la célula en la inactivación por PEAI. Mientras que tradicionalmente se ha pensado que a mayor tamaño de la célula menor resistencia (Hülshager y col. 1983; Zimmermann y col. 1974), de ahí la mayor sensibilidad de las levaduras, estudios más recientes han mostrado (Heinz y col. 2002) que la estructura y grosor de las membranas celulares (características diferenciadoras entre Gram positivo y Gram negativo) y la forma de las células también son factores a considerar.

FASE DE CRECIMIENTO

Por regla general, las células en fase exponencial de crecimiento son más sensibles a los PEAI que las células en fase estacionaria (Álvarez y col., 2000; Gásková y col. 1996; Hülshager y col. 1983; Pothakamury y col., 1996; Rodrigo y col. 2003; Wouters y col., 1999). Esta mayor sensibilidad puede ser debido a una mayor inestabilidad electromecánica de la membrana consecuencia de la continua división celular que ocurre en esta fase de crecimiento o a un mayor tamaño de las células (Jacob y col. 1981).

CONCENTRACIÓN CELULAR

Existen estudios contradictorios sobre el efecto de la concentración inicial de microorganismos en la inactivación de los mismos. Hülshager y Niemann (1980) y Barbosa-Cánovas y col. (1999) han observado una influencia de la concentración

inicial en la inactivación, mientras que otros estudios no lo han observado (Álvarez y col., 2000; Zhang y col., 1995).

II.2.2.3 Factores relacionados con el producto.

La composición del alimento o del medio de tratamiento tiene una influencia importante en la efectividad de los PEAI desde el punto de vista de inactivación microbiológica. Los factores relacionados con la composición de los alimentos se pueden dividir en: (i) aquellos que, aunque no están relacionados directamente con el proceso de inactivación por PEAI, influyen en el mismo (efecto sinérgico o efecto acumulativo) debido a sus propiedades antibacterianas (pH, presencia de bactericidas); (ii) aquellas características del producto que están relacionados directamente en el proceso de inactivación (fuerza iónica, fuerza dieléctrica y conductividad iónica).

Los estudios del efecto de uno de estos factores en la inactivación por PEAI son complejos ya que generalmente, la modificación de uno de ellos puede afectar a otro que esté relacionado con la capacidad de inactivación.

En general, al igual que ocurría con los factores biológicos, la influencia de estos factores en la inactivación microbiológica no está clara por lo contradictorio de los resultados publicados.

pH

Numerosos trabajos publicados (Vega-Mercado y col. (1996b), Dunne y col. (1996) y García y col. (2005)) han puesto de manifiesto que una disminución del pH incrementa la inactivación de microorganismos, variando el incremento en función de la especie (Wouters y col., 2001).

ACTIVIDAD DE AGUA

Existen pocos estudios respecto al efecto de la actividad de agua en la inactivación de microorganismos por PEAI. Los resultados existentes indican que en medios con actividad de agua baja, los microorganismos son más resistentes a los pulsos eléctricos (Álvarez y col., 2000, 2002, 2003a; Somolinos y col., 2008).

FUERZA IÓNICA / CONDUCTIVIDAD

Probablemente la fuerza iónica, y por tanto la conductividad eléctrica, sea el factor que más influya en el proceso. Como la conductividad define la resistencia de las cámaras de tratamiento, al disminuir la conductividad se reduce el incremento de la temperatura y la energía aplicada, incrementándose así la energía de campo eléctrico y la efectividad. Sin embargo hay que tener en cuenta que se requiere una cantidad mínima de iones para establecer el potencial transmembrana (Hülshager y col. 1981; Jayaram y col. 1993; Vega-Mercado y col. 1996b). La conductividad eléctrica se ve influenciada por la temperatura. Un incremento de la temperatura produce un aumento en la movilidad de los iones y por tanto un aumento de la conductividad (Heinz y col. 2002).

FUERZA DIELECTRICA

Se define la fuerza dieléctrica como el máximo campo eléctrico que puede soportar un medio sin que se produzca la ruptura dieléctrica. La ruptura dieléctrica es un fenómeno negativo en el proceso de PEAI. Este fenómeno se produce cuando una descarga descontrolada de corriente eléctrica recorre el alimento produciendo un aumento de la temperatura dañando al alimento y al equipo. La presencia de burbujas y partículas en suspensión en alimentos son las causas más frecuentes de ruptura dieléctrica, ya que presentan fuerzas dieléctricas diferentes al resto del alimento, y por tanto limitan la intensidad del tratamiento. La intensidad de campo eléctrico adecuado para el tratamiento de un alimento debe ser lo suficientemente

alto para alcanzar una inactivación adecuada pero sin que se produzca la ruptura dieléctrica (Lindgren, 2001).

GRASAS Y PROTEÍNAS

Existen numerosos estudios que describen la menor inactivación de microorganismos suspendidos en alimentos complejos frente a aquellos suspendidos en medios de referencia (Grahl y Märkl, 1996; Ho y col. 1995; Martín y col. 1997; Pina y col. 2007; Zhang y col. 1994a). La presencia de grasas y proteínas, en definitiva, una mayor complejidad del alimento, tiene un efecto protector de los microorganismos frente a los PEAI (Sampedro y col. 2006). Sin embargo, debido a lo contradictorio de los resultados, se requiere de una mayor profundidad del estudio del efecto de estas moléculas en el tratamiento por PEAI (Mañas y col. 2001).

11.2.3_Inactivación microbiológica por PEAI

11.2.3.1 Mecanismo de inactivación.

Es bien conocido que la aplicación de un campo eléctrico lo suficientemente grande a una célula produce una permeabilización reversible de su membrana celular. A este fenómeno se le denomina “electroporación”, y es ampliamente usado en el ámbito de la biotecnología ya que permite la introducción de diversas sustancias (ADN o proteínas) en células vivas. De igual modo, es usado como método para la extracción de constituyentes intracelulares.

Diversos estudios han establecido una correlación entre la electroporación y la inactivación microbiana (Heinz y col. 2002; Wouters y col. 2001).

Sale y Hamilton (1968) y Zimmerman (1986) proponen la teoría de la “ruptura dieléctrica”, donde la membrana celular se compara con un condensador en cuyo interior hay un material con una constante dieléctrica baja en comparación con el interior y el exterior de la célula. Esta diferencia de constantes produciría una

acumulación de cargas de signo contrario en ambos lados de la membrana generándose un potencial de transmembrana. Esta teoría asume que la aplicación de un campo eléctrico externo produce un aumento del número de cargas a ambos lados de la membrana y por tanto un aumento del potencial de transmembrana proporcional al aumento de la intensidad de campo aplicado. La atracción de las cargas de diferente signo a ambos lados de la membrana como consecuencia de la aplicación del campo eléctrico produce una compresión de la membrana, siendo mayor la compresión cuanto menor sea el grosor de la membrana. Una fuerza viscoelástica se opone a la compresión de la membrana, produciéndose una ruptura localizada (poro) cuyo la fuerza de la segunda es superior a la primera. El número y tamaño de los poros formados depende de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo de tratamiento. Al valor de la intensidad de campo a partir del cual se forman poros se le denomina intensidad de campo eléctrico crítico (E_c).

La permeabilización puede ser reversible o irreversible dependiendo del tamaño y número de poros. Cuando cesan las condiciones de tratamiento que producen los poros y éstos se cierran, se ha producido una permeabilización reversible, mientras que es irreversible en el caso de que la membrana no vuelva a la configuración inicial sin poros. La inactivación celular ocurre por el incremento de la permeabilidad de la membrana que posibilita el intercambio molecular entre la célula y el medio, causando un desequilibrio osmótico.

11.2.3.2 Daño celular producido por el tratamiento

Cuando una célula se somete a un estrés (pH, calor, altas presiones, pulsos eléctricos,...) se puede comportar de dos formas diferentes, o sobrevive o muere (efecto de “todo o nada”). Sin embargo es bien conocido que en la población de células supervivientes, puede haber una fracción que hayan sufrido un daño pero que en condiciones óptimas se recuperen totalmente. A este daño se le denomina “daño subletal”. La capacidad de recuperación del daño de una célula cuyo es

sometida a un estrés es un factor importante a considerar cuando se estudia un proceso de conservación de alimentos, concretamente en la aplicación de la “tecnología de barreras”. Es de especial gravedad la posibilidad de recuperación de especies patógenas psicrófilas, como es el caso de la *L. monocytogenes*, durante el almacenamiento refrigerado. Se han realizado numerosos estudios sobre si la inactivación microbiológica por PEAI sigue un comportamiento de “todo o nada”. Para estudiar la existencia de células dañadas y su posible recuperación se han llevado a cabo principalmente dos tipos de estudios: (i) recuento comparativo en dos medios de siembra, uno selectivo (células vivas no dañadas) y otro no selectivo (células vivas), de muestras tratadas; (ii) estudio de las curvas de crecimiento de los microorganismos tras ser tratados.

A pesar de la inicial controversia de la existencia o no de daño subletal en microorganismos tratados por PEAI, estudios recientes han demostrado la existencia del mismo (Arroyo y col., 2010; Pina-Pérez y col., 2009; Saldana y col., 2010; Somolinos y col., 2010). Parece ser que en los estudios donde se observa daño subletal, éste depende del tipo de microorganismos, de las condiciones de tratamiento y de las propiedades del medio (García y col. 2003; Picart y col. 2002; Saldana y col. 2009; Wouters y col. 2001;). La mayoría de los estudios cuantifican el daño subletal mediante la doble siembra (Pina-Pérez y col., 2009; Saldana y col., 2009; Saldana y col., 2010). Selma y col. (2003) estudiaron las curvas de crecimiento de *E. aerogenes* en horchata estéril tras ser tratada por PEAI y almacenada a diferentes temperaturas. Mientras que el “ratio de crecimiento” de las curvas no variaba, la fase lag de las curvas de crecimiento de las células tratadas era superior que la de las células sin tratar. El aumento de la fase lag puede indicar una reparación y un periodo de adaptación de las células y por tanto indicativo de presencia de células dañadas. No obstante, otras técnicas, como el uso de yoduro de propidio (Jaeger y col., 2010a; Somolinos y col., 2010), la citometría de flujo (Jaeger y col., 2010a) y los estudios de proteómica (Cebrián y col., 2009;

Somolinos y col., 2010) se están utilizando para evaluar y estudiar el daño provocado en las células al ser tratadas por PEAI.

II.2.4 Inactivación enzimática por PEAI.

La destrucción de enzimas que afectan negativamente a la calidad de los alimentos es un factor a tener en cuenta en la conservación de los alimentos. Los estudios de inactivación microbiológica por PEAI centraron en un principio la mayor parte de los esfuerzos de los grupos de trabajo. Sin embargo, en los últimos años, viendo la viabilidad de la tecnología de los pulsos en inactivar microorganismos, han aumentado los trabajos que se centran en evaluar la tecnología desde el punto de vista de la calidad del producto tratado, siendo el efecto sobre la actividad enzimática uno de los factores más estudiados tanto en medios de referencia como en alimentos, principalmente en zumo de frutas y leche. En general, la inactivación enzimática depende del tipo de enzima, del medio de referencia o alimento y de las condiciones de tratamiento. Incluso en algunos casos, el tratamiento por PEAI puede incrementar la actividad enzimática (Bendicho y col. 2001, 2002a; Giner y col., 2001, 2002; Vega-Mercado y col., 1995).

Al igual que en el tratamiento térmico, la resistencia de las enzimas al tratamiento por pulsos eléctricos es superior que la resistencia de los microorganismos, siendo beneficioso en aquellos alimentos donde se requiera la actuación de las enzimas para obtener el producto final.

Aunque el mecanismo de inactivación enzimática por PEAI no está dilucidado completamente (Giner y col. 2001), parece ser que las enzimas tratadas por PEAI pueden presentar una desnaturalización y desdoblamiento de la estructura de la proteína, una rotura de los enlaces covalentes, y reacciones redox entre los grupos sulfuro y los enlaces disulfuro (Barsotti y Cheftel, 1999). Castro (1994) y Vega-Mercado (1995) sugieren que cambios en la conformación en la estructura de la enzima son los responsables de la pérdida de actividad. Por tanto la sensibilidad al

tratamiento entre las distintas enzimas se puede deber a la diferencia en su estructura molecular (Giner y col. 2002).

Se han realizado estudios de inactivación enzimática por PEAI de pectinmetilesterasas (Giner y col. 2005; Riener y col., 2009b; Rodrigo y col. 2001; Salvia-Trujillo y col., 2011; Timmermans y col., 2011; Van Loey y col. 2002), polifenol-oxidasas (Giner y col. 2001, Giner y col. 2002; Meneses y col., 2011), peroxidasas (Chen y col., 2011; Jaeger y col., 2010b; Yang y col. 2004), poligalacturonasas (Salvia-Trujillo y col., 2011), fosfatasa alcalina (Jaeger y col., 2010b; Riener y col., 2009a; Van Loey y col. 2002), proteasas (Bendicho y col. 2001; Riener y col., 2009a; Vega-Mercado y col., 2001), lipasas (Bendicho y col. 2001, 2002a; Riener y col., 2009a) y lipoxigenasas (Chen y col., 2011; Xiu y col., 2010) tanto en medios de referencia como en alimentos. Diferentes estudios muestran que el origen (tomate, naranja, zanahoria y banana) de la enzima (PME) influye en la inactivación alcanzada (Elez-Martínez y col. 2007), incluso también la variedad (Clementina, Ortanique y Valencia Late) de una misma fruta (Sentandreu y col. 2006).

Se ha verificado que la combinación de pulsos eléctricos de alta intensidad y temperaturas suaves es una estrategia válida para incrementar la efectividad del tratamiento sin una pérdida destacable de la calidad del alimento tratado (Kanbiz y col., 2008; Riener y col., 2009b; Van Loey y col. 2002; Yeom y col., 2000).

II.2.5_Efecto de los PEF en componentes nutricionales

Un aspecto importante a tener en cuenta en la conservación de alimentos, debido a la exigencia de los consumidores de alimentos lo más parecido a los naturales y que tengan un alto poder nutritivo, es el estudio del efecto de las tecnologías de conservación sobre los nutrientes del alimento.

Los estudios realizados hasta el momento han mostrado la validez de esta tecnología desde el punto de vista de preservar los componentes nutricionales en

mayor medida que las tecnologías de conservación de alimentos basados en el calor. Principalmente se han realizado estudios en leche y zumos de frutas, cuantificando principalmente el efecto de los PEAI en vitaminas, carotenoides, proteínas y actividad antioxidante (Barsotti y col. 2002; Bendicho y col. 2002b; Evrendilek, 2000; Jeantet y col. 1999; Yeom y col. 2000b; Zulueta y col., 2010 a y b) y recientemente se han llevado a cabo estudios del efecto de la tecnología en ácidos grasos e isoflavonas en bebidas derivadas de la soja (Morales de la Pena y col., 2010; Morales de la Pena y col., 2011).

II.2.5.1 Vitaminas

Existen numerosos estudios de efectos de los PEAI en vitamina C en zumo de naranja y derivados (Ayhan y col. 2001; Ke-Fang y col., 2009; Sánchez-Moreno y col., 2005a; Torregrosa y col. 2006a). Las pérdidas varían entre un 0,2% y un 15%, dependiendo de las condiciones de tratamiento (tipo y número de pulsos, temperatura de tratamiento y cantidad de oxígeno disuelto en el zumo). Torregrosa y col. 2006a modelizaron las curvas de inactivación por PEAI de vitamina C en zumo de naranja-zanahoria (25-40 kV/cm; 30-340 μ s), no apreciándose claramente una relación entre intensidad de campo eléctrico y la constante de degradación de vitamina C. Además de las menores pérdidas de vitamina C en zumo tratado por PEAI que en el tratado térmicamente (Ayhan y col. 2001; Torregrosa y col. 2006a), la evolución de su contenido durante el almacenamiento también es mejor en el zumo de naranja y naranja-zanahoria tratados por PEAI (Ayhan y col. 2001; Torregrosa y col. 2006).

Bendicho y col. (2002b) procesaron por PEAI (18-27 kV/cm; 10-118 pulsos de caída exponencial de 4 μ s; y dos temperaturas de tratamiento comprendidas entre 20-25°C o 50-55°C) leche desnatada y SMUF enriquecidas con vitaminas (riboflavina, tiamina, ácido ascórbico y tocoferol). El ácido ascórbico fue la única vitamina que sufrió pérdidas, un 28 % en leche desnatada y un 39% en SMUF, para

un tratamiento cercano a 500 J/ml. Por tanto, se observó un efecto protector de los constituyentes de la leche en la destrucción del ácido ascórbico.

11.2.5.2 Carotenoides.

Diversos estudios se han centrado en el efecto de los PEAI sobre los carotenoides y vitamina A, también en zumo de naranja y derivados. Sánchez-Moreno y col. (2005a) no observaron modificaciones significativas al tratar zumo de naranja por PEAI (35 kV/cm; 750 μ s) ni en el contenido individual o total de carotenoides ni en el contenido de vitamina A. Sin embargo, Torregrosa y col. (2006b) al tratar zumo de naranja-zanahoria por PEAI (25-40 kV/cm; 39-340 μ s) o térmicamente (98°C; 21 s), observaron que con ambas tecnologías el contenido en vitamina A se modificaba, siendo mayor el contenido en el zumo tratado por PEAI. Resultados similares se observaron al tratar por PEAI o calor la bebida mezcla de zumo de naranja y leche (Zulueta y col., 2010a).

11.2.5.3 Proteínas.

El efecto de los PEAI en proteínas se ha estudiado principalmente en leche, huevo y soja. Jeantet y col. (1999) y Fernández-Díaz y col. (2000) no observaron cambios permanentes en disoluciones de proteínas de huevo ultrafiltradas y de ovalúminas respectivamente, al ser tratadas por PEAI. En el caso de disoluciones de β -lactoglobulina, mientras Pérez y Pilosof (2004) observaron cambios en ciertas propiedades, como la temperatura de desnaturalización y el índice de gelatinización, Barsotti y col. (2002) no observaron agregación y desplegamiento de la proteína al ser tratada. Yingqiu Li y col. (2007) al tratar proteínas aisladas de soja (SPI), observaron que las propiedades de solubilidad, contenido en grupos sulfhidrilos libres (SHF) y reagregación variaban en función de la intensidad de campo y tiempos aplicados, observando también la no ausencia de modificaciones significativas en la estructura secundaria de la proteína.

II.2.5.4 Actividad Antioxidante

El efecto benéfico sobre la salud de las frutas y hortalizas se atribuye principalmente a los polifenoles, la vitamina C, los carotenoides y la vitamina E, por su acción antioxidante. Debido a la importancia de dicha acción en la salud, se han estudiado el efecto de las tecnologías de conservación en la actividad antioxidante de los alimentos. Mientras Sánchez-Moreno y col. (2005a), Elez-Martínez y col. (2007) observaron que la tecnología de los PEAI no afectaba a la actividad antioxidante del zumo de naranja y del gazpacho, Morales de la Pena y col. (2010) observaron un descenso de la actividad antioxidante en una bebida mezcla de zumo de frutas y leche de soja tratada por PEAI durante el almacenamiento, siendo menor el descenso que el producto tratado térmicamente.

II.2.6 Modelos cinéticos de inactivación

Los primeros estudios de cinéticas de inactivación de microorganismos por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad aplicaron modelos cinéticos que se utilizaban en conservación por calor de alimentos.

Tradicionalmente la inactivación térmica de microorganismos (tanto células vegetativas como esporas) estaba considerada como un proceso que seguía una cinética de primer orden. Cuando una suspensión homogénea de bacterias se somete a un tratamiento térmico a temperatura constante, éstas se inactivan a velocidad constante. Es decir, el número de células viables se reduce exponencialmente con el tiempo de exposición a una temperatura letal, ajustándose los microorganismos supervivientes a una progresión geométrica (Periago, 1998). Entonces, si se representa gráficamente el logaritmo decimal del número de microorganismos supervivientes frente a los tiempos de exposición, se obtiene una línea recta, conocida como “curva de supervivencia”. Existen diversas teorías que intentan explicar el comportamiento logarítmico de la curva de supervivencia. Según Rahn (1929, 1945), la inactivación tiene lugar a nivel molecular donde una

bacteria se inactiva cuando una molécula esencial se desnaturaliza. A este enfoque se le denomina “teoría mecanística”. Por tanto la muerte se puede asemejar como una reacción química unimolecular o bimolecular de primer orden, expresándose la muerte bacteriana de igual forma que las reacciones químicas de primer orden:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad (\text{Ec. II.7})$$

Integrando la ecuación anterior entre N_0 (concentración inicial de bacterias) y N (concentración final de bacterias tras un tratamiento por PEAI) a tiempo t , y sustituyendo $D = k/2.3$, se obtiene:

$$\text{Log}(S) = -\frac{t}{D} \quad (\text{Ec. II.8})$$

donde S es la fracción de supervivientes (N/N_0) tras un tiempo t de tratamiento y D es el tiempo de reducción decimal, que se define como el tiempo de tratamiento requerido a una temperatura o intensidad de campo dados, para reducir una población bacteriana a la décima parte (Katzin y col., 1943).

Sin embargo, en estudios realizados en las últimas décadas del siglo pasado se observaron que la muerte de los microorganismos no seguía una relación lineal con el tiempo de exposición, alejándose de la “teoría mecanística”. Una de las teorías que se han propuesto para explicar este alejamiento de la relación lineal muerte/tiempo de exposición es la “teoría vitalística”. Esta teoría propone que la no linealidad de la curva de supervivencia es debido a una serie de reacciones subyacentes que experimenta la célula o espora al factor letal (Yerson y col., 1996). Además establece que no todas las células de una población presentan la misma resistencia a la inactivación, existiendo así una distribución de tiempos de inactivación que puede ser descrita como una función de densidad (Van Boeckel, 2002).

Los primeros estudios de inactivación microbiológica por PEAI ajustaron las curvas de supervivencia a modelos cinéticos de primer orden (Dunn y Pearlman,

1987; Martín-Belloso y col. 1997; Qin y col. 1995; Raso y col. 1998; Vega-Mercado y col. 1996a; Zhang y col. 1994b).

Hülsheger y Niemann (1980) desarrollaron el primer modelo cinético de inactivación para la tecnología de los PEAI. Este modelo se basa en la existencia de dos relaciones lineales, una entre el logaritmo natural de la fracción de supervivientes y el logaritmo del tiempo de tratamiento (Ecuación II.9), y la otra entre el logaritmo natural de la fracción de supervivientes y la intensidad de campo eléctrico (Ecuación II.10).

$$\ln(S) = -b_t \cdot (\ln(t) - \ln(t_c)) \quad (\text{Ec. II.9})$$

$$\ln(S) = -b_E (E - E_C) \quad (\text{Ec. II.10})$$

donde b_E y b_t son los coeficientes de regresión, E el campo eléctrico aplicado, t el tiempo de tratamiento aplicado, E_C es el campo crítico, el mayor de los campos eléctricos para el cual el valor de la fracción de supervivientes es 1, y t_C es el tiempo de tratamiento crítico, a partir del cual la fracción de supervivientes es menor que 1 (**figura I.6**). Los coeficientes de regresión representan la pendiente de la recta y dependen del microorganismo y del medio de tratamiento.

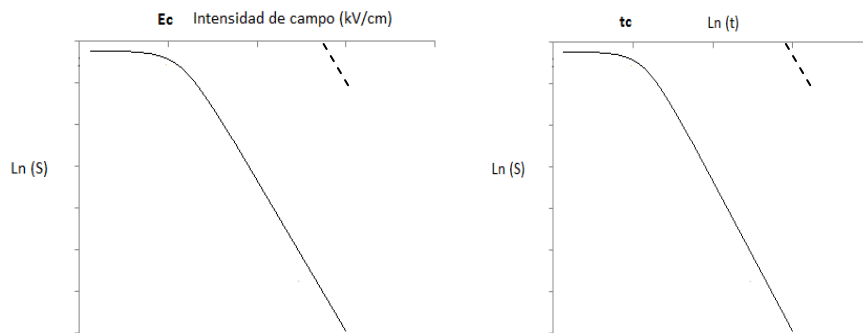


Figura II.5. Representación de curvas de supervivencia según el modelo de Hülsheger.

Una de las funciones de distribución que más se han utilizado para describir las curvas de supervivencia de microorganismos es la distribución de frecuencias de Weibull. Esta distribución se caracteriza por su simplicidad (el modelo se define con dos parámetros) y por su flexibilidad, ya que es capaz de interpretar curvas con hombros, colas o líneas rectas. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para interpretar curvas de supervivencia de microorganismos tratados por calor, altas presiones hidrostáticas, radiación y PEAI, entre otras tecnologías. La función de densidad en términos de inactivación microbiana se representa de la siguiente forma:

$$\ln(S) = -\left(\frac{t}{a}\right)^n \quad (\text{Ec.II.11})$$

donde a y n son los parámetros de escala y forma respectivamente, estando el primero relacionado con la intensidad de tratamiento y el segundo con la forma de la gráfica de supervivencia. Cuando $n < 1$ las curvas de supervivencia presentan colas, es decir, las células que quedan por inactivar tienen menos probabilidad de morir, ya sea porque son más resistentes o porque se han adaptado mejor al estrés. Cuyo $n > 1$, las curvas de supervivencia presentan hombros indicio que las células son cada vez más sensibles, es decir, que existe un daño acumulado. En el caso de que $n = 1$, cada célula es igual de sensible al tratamiento (Van Boekel, 2002) (Figura II.11).

A partir de los parámetros que definen el modelo de Weibull, se puede calcular un parámetro indicativo de la resistencia del microorganismo al tratamiento ($\overline{t_{cw}}$), llamado tiempo medio crítico (Peleg (1999)) y viene definido por la siguiente ecuación:

$$\overline{t_{cw}} = a * \Gamma(1 + n^{-1}) \quad (\text{Ec.II.12})$$

donde Γ es la “función gamma”.

El modelo de Weibull ha sido aplicado para interpretar curvas de supervivencia de microorganismos tratados por PEAI tanto en tampones como en alimentos. San Martín y col. (2007), Gomez y col. (2005a y b), Álvarez y col. (2003a, b, c y d) y Rodrigo y col. (2001) observaron la idoneidad del modelo de Weibull para explicar las curvas de inactivación por PEAI de diversos microorganismos (*Listeria innocua* y *monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* y *Typhimurium*, *Escherichia coli coli* y *Lactobacillus plantarum*) en medios de referencia. Rodrigo y col. (2003a, b) y (2001), Sampedro y col. (2006) y Pina y col. (2007) observaron que el modelo de Weibull era el que mejor se ajustaba a las curvas de supervivencia de diversos microorganismos (hongos y levaduras y mesófilos aerobios, *E. coli* y *L. plantarum*, *Cronobacter sakazaki*) en diversos alimentos tratados por PEAI. Además, Rodrigo y col. (2003a) desarrollaron un modelo matemático experimental que relacionaba el logaritmo natural de la fracción de supervivientes de *E. coli* con el tiempo de tratamiento, intensidad de campo eléctrico y concentración de zumo de zanahoria.

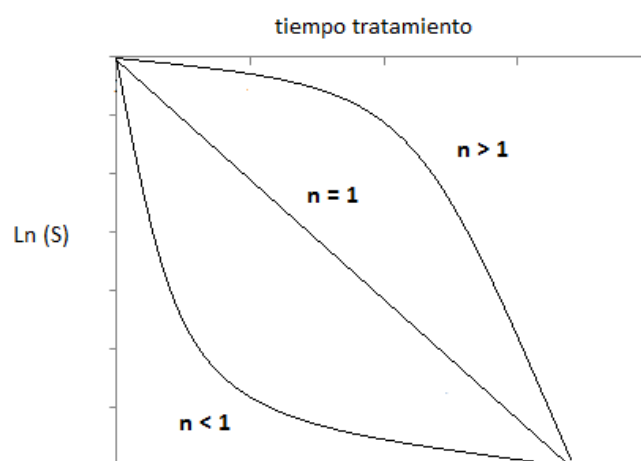


Figura II.6. Representación de curvas de supervivencia según el modelo de Weibull en función del valor del parámetro de forma (n).

Otros modelos que se han usado para explicar las curvas de supervivencia de microorganismos o enzimas tratados por PEF o por otras tecnologías de conservación han sido la ecuación de Fermi (Peleg, 1995 y Sensoy y col., 1997), el modelo de Baranyi (Baranyi y col., 1993; Baranyi & Roberts, 1994) y el modelo Log-logístico (Raso y col., 2000).

La ecuación de Fermi viene definida por:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{1}{1 + \exp\left[\frac{(E - V_c)}{k_e}\right]} \quad (\text{Ec.II.13})$$

donde E es la intensidad del campo eléctrico aplicado (kV/cm), V_c (kV/cm) es el valor crítico de E para el que se ha alcanzado un 50% de inactivación, y k_e es el parámetro que indica lo pronunciado que es la curva en V_c . Un menor valor de k_e indica una alta sensibilidad a los PEAI. Tanto el valor de k_e como de V_c dependen del número de pulsos o del tiempo de tratamiento (Góngora-Nieto y col. 2002a).

El modelo de Baranyi se desarrolló originalmente para explicar curvas de crecimiento (Baranyi y col., 1993; Baranyi & Roberts, 1994), siendo adaptada por Xiong y col. (1999) para explicar curvas de supervivencia, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log_{10}\left(q_B + (1 - q_B)e^{-k_{\max}(t - B(t))}\right) \quad (\text{Ec.II.14})$$

donde

$$B(t) = \frac{r}{3} \left(\frac{1}{2} \ln \frac{(r+t)^2}{r^2 - rt + t^2} + \sqrt{3} \arctan \frac{2t-r}{r\sqrt{3}} + \sqrt{3} \arctan \frac{1}{\sqrt{3}} \right) \quad (\text{Ec.II.15})$$

Este modelo se adapta bien para curvas que presenten colas, hombros y curvas con forma sigmoideal. El parámetro q_B es un indicador de la presencia de colas en las curvas; k_{\max} es el índice de máxima destrucción y es la constante que define la fase lineal de la curva; $B(t)$ es la función de la fase lag, que viene definida por el parámetro r , que es el tiempo necesario para alcanzar la mitad de k_{\max} .

La ventaja de este modelo es su versatilidad para interpretar tanto a curvas no sigmoidales, como a aquellas que solo presenten colas ($q_B = 0$) (Ecuación II.16), hombros o sean líneas rectas:

$$\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{t - B(t)}{D_{\min}} \quad (\text{Ec.II.16})$$

donde $D_{\min} = 2.303/k_{\max}$, siendo el tiempo mínimo de reducción decimal el tiempo mínimo requerido para reducir un ciclo logarítmico la población microbiológica.

El modelo Log-logístico viene definido por:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log S_0 + \frac{(\log S_n - \log S_0)}{1 - \exp\left(\frac{4 \cdot \Lambda \cdot (t_s - \log t)}{\log S_n - \log S_0}\right)} \quad (\text{Ec.II.17})$$

donde S_0 es la fracción de supervivientes inicial a tiempo 0, S_n es la fracción final de supervivientes, Λ es la pendiente máxima, t_s es el tiempo donde se alcanza la máxima pendiente y t es el tiempo de tratamiento.

Además de todos estos modelos, otros estudios han desarrollado modelos empíricos. **Álvarez y col. (2003d)** desarrollaron un modelo empírico para las curvas de supervivencia de *E. coli* para intensidades de campo comprendidas entre 22 y 28 kV/cm.

II.2.7 Aplicaciones de la tecnología de los PEAI

Principalmente, el estudio de la tecnología de los Pulsos Eléctricos, se ha centrado en la pasteurización de alimentos y en la extensión de la vida útil de productos tratados térmicamente. Sin embargo, existen otras líneas de trabajo que amplían el abanico de posibles usos de esta tecnología.

Otros estudios se han centrado en el aumento del rendimiento en procesos relacionados con la transferencia de masas. Se ha constatado una mejora de la extracción de zumos en tejidos de origen vegetal (zanahoria, manzana, remolacha de azúcar, entre otros) cuyo son sometidos a pulsos eléctricos de baja intensidad

(0,1 a 5 kV/cm). Se ha observado que la aplicación de los PEAI antes o durante la presión mecánica del tejido mejora el rendimiento de extracción de zumos (Bouzzara y Vorobiev, 2000; 2001; Estiaghi y Knorr, 1999 y 2002; Knorr y col., 1994). Otros estudios muestran que la aplicación de pulsos de 0,1 a 0,2 kV/cm en alimentos sólidos aumenta el coeficiente de difusividad de sustancias solubles (Eshtiaghi y Knorr., 1999; Jemai y Vorobiev, 2002 y 2005), siendo una alternativa a la aplicación de campos de corriente continua o alterna, minimizando la electrolisis y la generación de calor (Jemai y Vorobiev, 2002). En todas estas aplicaciones se han utilizado equipos de PEAI con cámaras de tratamiento estáticas.

Los Pulsos Eléctricos también se han aplicado en el campo de la biotecnología y de la medicina como la electrofusión (técnica usada en la hibridación de plantas) y la electrotransformación (técnica usada para la obtención de organismos genéticamente modificados).

II.2.8 Costo económico y energético de la tecnología de los PEAI.

Un factor fundamental en la implantación de cualquier nueva tecnología es el gasto energético y por ende, el costo económico.

El gasto energético de la tecnología de los PEAI depende del campo de aplicación. En el caso de su aplicación en el campo de la transferencia de masas, la energía requerida por los PEAI para desintegrar los tejidos es del orden de 1 a 5 kJ/kg de producto en contraste con los tratamientos convencionales que requieren mayor energía (20 - 40 kJ/kg para tratamientos mecánicos; 60 – 100 kJ/kg para tratamientos enzimáticos; más de 100 kJ/Kg para procesos térmicos) (Toefl y col. 2006).

Los tratamientos de pasteurización por PEAI implican un consumo energético superior (100 a 1000 kJ/kg) que en los procesos de transferencia de masas (5 kJ/kg) (Toefl y col. 2006). En los tratamientos por PEAI manteniendo temperaturas de

producto inferiores a 30 °C, además hay que tener en cuenta tanto la energía consumida durante el tratamiento (548 - 705 kJ/Kg) como el consumo durante el enfriamiento del producto entre las diferentes cámaras de tratamiento, incrementándose el consumo energético hasta 1400 kJ/kg (Evrendilek y Zhang, 2003). Por tanto, la combinación de los PEAI a temperaturas suaves es una estrategia válida, no solo para incrementar la inactivación enzimática o microbiológica, sino para disminuir el el gasto energético. Heinz y col. 2003 observaron que aumentar la temperatura de 35 a 55°C, implicaba una reducción del gasto energético de 100 a 40 kJ/kg necesarios para alcanzar inactivaciones de 6 reducciones logarítmicas de *E. coli* en zumo de manzana. A priori, la aplicación de los PEAI requiere mayor energía que los tratamientos térmicos convencionales. Sin embargo, Toefl y col. 2006 asegura que la combinación de PEAI y temperaturas suaves reduciría el consumo energético hasta valores próximos a los alcanzados por el tratamiento térmico (20 kJ/kg).

Debido a que es una tecnología emergente, el coste de los equipos es elevado. Jin y Zhang 2002 estimaron un coste de producción de zumo de naranja procesado por PEAI durante el periodo de amortización del equipo de 0,076 \$/L frente a los 0.047 \$/L de zumo procesado por calor. Sin embargo, una vez que se ha amortizado el equipo, los costes de producción se igualan para ambas tecnologías (0.033\$/L por PEAI frente a 0.034\$/L por calor).

II.2.9_Equipos existentes de tratamiento por PEAI.

Actualmente existen en el mercado equipos a escala de laboratorio y de planta piloto. Con respecto a los primeros, existe una gran variedad, diferenciándose principalmente por el tipo de régimen de trabajo (estático o en continuo), por el tipo de pulso aplicado (caída exponencial o cuadrados principalmente) y por la geometría de las cámaras de tratamiento.



Figura II.7. Equipo comercial de PEAI y sistema de cámaras co-field para tratamiento de aguas residuales desarrollado por DTI.

En menor medida, se han desarrollado equipos a escala de planta piloto y comercial. Los equipos de planta piloto tienen una capacidad de tratamiento entre 80 y 200 L/h, mientras que los equipos a escala comercial alcanzan producciones de hasta 10000 L/h. En la actualidad no hay ninguna empresa que comercialice alimentos tratados por PEAI, sin embargo sí hay empresas que comercializan equipos de tratamiento por PEAI. La empresa Diversified Technologies Inc. (DTI) en colaboración con la Ohio State University desarrolló equipos de PEF con altas producciones, tanto para tratar alimentos como aguas residuales, con producciones de hasta 10.000 l/h en el caso del tratamiento de aguas (figura I.8 y I.9), y en régimen continuo, aplicando pulsos cuadrados (mono o bipolares) con cámaras tipo co-field.



Figura II.8. Equipos desarrollados por DTI para la Ohio State University (izq.) y la Universidad de Salerno (dcha.) capaces de tratar 5000 l/h y 400 l/h respectivamente.

II.2.10 Ventajas y desventajas de la tecnología de los PEAI.

La tecnología de los PEAI presenta una serie de ventajas y desventajas que hay que tener en cuenta a la hora de tratar alimentos.

DESVENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA

- Limitada su aplicación a alimentos líquidos homogéneos o que contengan partículas o pequeñas burbujas de gas.
- Limitada su aplicación a alimentos con conductividades eléctricas y viscosidades comprendidas en un intervalo.
- Uso de circuitos de refrigeración en aquellos alimentos con conductividades altas para evitar temperaturas superiores a 50°C.
- Aplicado para pasteurización de alimentos, siendo inefectivo para inactivar esporas bacterianas además de necesitar almacenamiento refrigerado en el caso de alimentos de baja acidez.

Muchas de estas desventajas se pueden solucionar en parte formulando los productos, mejorando el diseño del equipo o buscando las condiciones de tratamiento más adecuadas, de tal forma que el tratamiento por PEAI sea más efectivo.

VENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA

- Efectividad de la tecnología para inactivar microorganismos alteradores y patógenos.
- La combinación PEAI y temperaturas moderadas inactivan enzimas y microorganismos, a niveles similares a pasteurizaciones térmicas.
- Preserva en gran medida la calidad sensorial y nutricional de los alimentos en comparación con los tratamientos térmicos convencionales.

1.2.11 Necesidades de investigación

- Investigar más profundamente en los mecanismos de inactivación de microorganismos y enzimas.
- Identificar tanto los microorganismos patógenos más pulsorresistentes como los microorganismos indicadores sustitutivos de los patógenos. Desarrollo de métodos de validación para asegurar la eficiencia de la inactivación microbiológica. Establecer el nivel de inactivación del patógeno más resistente para garantizar la seguridad del alimento, de acuerdo con el cumplimiento del *objetivo de seguridad alimentaria* (FSO).
- Profundizar en la seguridad alimentaria de los alimentos tratados por PEAI. Estudiar la existencia de cambios de patogenicidad o virulencia de los microorganismos patógenos.
- Desarrollo y evaluación de modelos cinéticos que incluyan los factores críticos en la inactivación.

- Desarrollo de nuevos diseños de cámaras para mejorar la uniformidad y la capacidad de producción.
- Profundizar en la combinación de los PEAI con otras tecnologías de conservación para aumentar la inactivación. Estudiar las posibles resistencias adquiridas por los microorganismos al ser sometidos a estreses no letales.
- Reducir el costo de los equipos.
- Ampliar la gama de productos susceptibles de ser tratados por PEAI.

**OBJETIVOS Y
PLAN DE TRABAJO**

El OBJETIVO GENERAL de esta tesis es la “**evaluación de la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, calidad y preservación de compuestos nutritivos aplicada a la conservación de un alimento mezcla de zumo de naranja y leche**”

El objetivo general se desglosó en los siguientes OBJETIVOS PARCIALES:

1. Estudio del efecto de los parámetros de proceso campo eléctrico y tiempo de tratamiento sobre la inactivación de un microorganismo alterador (*Saccharomyces cerevisiae*), uno patógeno (*Escherichia coli*) y de la enzima pectinmetilesterasa (PME) presentes en una bebida a base de zumo y leche. Ajuste de los datos cinéticos a modelos de inactivación existentes en bibliografía.

2. Estudio del efecto de un parámetro ambiental (temperatura) sobre la inactivación de un microorganismo alterador (*Saccharomyces cerevisiae*) y de la enzima pectinmetilesterasa (PME) presentes en una bebida a base de zumo y leche. Ajuste de los datos cinéticos a modelos de inactivación existentes en bibliografía.

3. Estudio de la estabilidad de vitaminas hidrosolubles (biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina) y de péptidos inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina-I (ECA) tratadas por PEAI. Comparación con la estabilidad tras un tratamiento térmico convencional. Estudio del almacenamiento a 4°C de las muestras tratadas por PEAI o por calor.

4. Evaluación del daño subletal y del riesgo de aparición de transformantes de células de *Lactobacillus casei* y *Escherichia coli* tratadas por PEAI.

PLAN DE TRABAJO TESIS

1. Revisión Bibliográfica.

2. Caracterización de productos comerciales y formulación del nuevo alimento.

a. Análisis de las características físico-químicas de los productos comerciales derivados de leche y zumos de frutas.

b. Elección de la formulación adecuada de la bebida para el tratamiento por PEAI.

c. Puesta a punto del protocolo de realización de la bebida.

3. Inactivación de *E. coli* por PEAI inoculado en la formulación desarrollada.

a. Curva de crecimiento de *E. coli*.

b. Recolección de células en fase de crecimiento exponencial.

c. Tratamiento por PEAI del *E. coli* inoculado en el producto a diferentes intensidades de campo y tiempos de tratamiento.

d. Análisis estadístico de los resultados. Ajuste y obtención de los parámetros a diferentes modelos cinéticos.

e. Elección del modelo que mejor se ajuste a las curvas de supervivencia, cálculo de parámetros cinéticos secundarios y obtención de un modelo que relacione la fracción de supervivientes con la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento.

4. Inactivación de *S. cerevisiae* inoculado en la formulación desarrollada por PEAI. Influencia de la temperatura de entrada del producto.

a. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae*.

b. Recolección de células en fase de crecimiento estacionaria.

c. Tratamiento por PEAI de *S. cerevisiae* inoculado en el producto a diferentes intensidades de campo, tiempos de tratamiento y temperaturas de entrada del producto.

d. Análisis estadístico de los resultados. Elección del modelo que mejor se ajuste a las curvas de supervivencia por medio de la herramienta BestFit del software @Risk.

e. Cálculo de parámetros cinéticos primarios y secundarios e influencia en los mismos de la temperatura de entrada del producto.

f. Obtención de un modelo matemático experimental que relacione la fracción de supervivientes con la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento.

5. Inactivación de pectinmetilesterasa por PEAI. Influencia de la temperatura de entrada del producto.

a. Puesta a punto del análisis de la PME en el producto. Realización de las curvas de estabilidad de la PME en la bebida y sensibilidad del análisis.

b. Tratamiento por PEAI de la PME del producto a diferentes intensidades de campo, tiempos de tratamiento y temperaturas de entrada.

c. Análisis estadístico de los resultados. Ajuste y obtención de los parámetros para diferentes modelos cinéticos.

d. Elección del modelo que mejor se ajuste a las curvas de inactivación y obtención de un modelo matemático experimental que relacione la fracción de enzima residual con la intensidad de campo, el tiempo de tratamiento y la temperatura de entrada.

6. Comparación de la estabilidad de vitaminas hidrosolubles e inhibidores de la ECA tras el tratamiento por PEAI y térmico.

a. Estudio de la incorporación de las vitaminas hidrosolubles (biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina) y los inhibidores de la ECA en el producto.

b. Puesta a punto de análisis conjunto por HPLC-MS/MS de las vitaminas hidrosolubles en el producto.

c. Puesta a punto del análisis por espectrofotometría de la actividad de la ECA del producto.

d. Tratamiento por PEAI del producto fortificado a diferentes intensidades de campo y tiempos de tratamiento.

e. Tratamiento térmico del producto fortificado a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento.

f. Estudio de almacenamiento de las muestras tratadas por calor o por PEAI.

g. Análisis de los resultados debido al tratamiento y al almacenamiento.

7. Evaluación de la seguridad alimentaria de los PEAI en dos microorganismos de interés industrial: *E. coli* y *L. casei*.

a. Evaluación del daño subletal en los microorganismos debido al tratamiento por PEAI.

b. Evaluación del riesgo de aparición de transformantes en ambos microorganismos debido al tratamiento por PEAI.

c. Estudio del efecto de los PEAI en el mapa de proteínas del *E. coli*. Identificación de las proteínas que han variado al tratar las células con PEAI.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Naturaleza de la inactivación de
***Escherichia coli* suspendido en una bebida**
mezcla de zumo de naranja y leche

IV.1.1 INTRODUCCIÓN.

Se ha comprobado que en numerosos alimentos la aplicación de tecnologías de conservación no térmicas puede producir suficientes reducciones de la carga microbiológica como para incrementar la vida útil del alimento en condiciones de refrigeración. Los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI) es una de esas tecnologías. Esta tecnología puede ser considerada como una alternativa a la pasteurización por calor en alimentos líquidos porque, debido a naturaleza no térmica, se ha mostrado que no afecta significativamente a las características naturales del producto final (Bendicho y col, 2002; Qin y col, 1996; Yeom y col, 2000).

Recientes brotes de *E. coli* en alimentos, tales como sidra de manzana, zumo de manzana fresco y zumo de naranja, han destacado la tolerancia a la acidez y la probable baja dosis infectiva de este patógeno (Anonymous, 1996; Besser y col, 1993; Cook y col., 1998; Parish, 1997; Sivapalasingam y col. 2004; U.S. Department of Health and Human Services (USDHHS)). Estos descubrimientos fortalecen la necesidad de llevar a cabo estudios profundos para comprobar la naturaleza de la muerte de *E. coli* en un alimento ácido pasteurizado por PEA. Por tanto, se hace esencial el desarrollo de modelos que interpreten las curvas de supervivencia de *E. coli* en este tipo de alimento tratado por PEA.

El objetivo de este estudio es investigar la inactivación por PEA de *E. coli* suspendido en un alimento ácido y complejo como es la bebida mezcla de zumo de naranja y leche. Los datos de inactivación fueron ajustados a diferentes modelos de inactivación descritos en la literatura para establecer cuál de ellos proporciona una mejor descripción de las curvas de inactivación de *E. coli* por PEA.

IV.1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.1.2.1 Preparación de la bebida.

La preparación de la bebida se preparó según el protocolo descrito en el ANEXO 1.

Se determinó en la bebida la conductividad eléctrica (Crison 525 conductimeter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), el pH (Crison 2001 pH-meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), la viscosidad (Haake Viscotester VT5, Thermo Electron Corporation, Sussex, UK), y el contenido en sólidos solubles (Atago RX-1000 digital refractometer, Atago Company Ltd, Tokyo, Japan). Los resultados de los análisis físico-químicos fueron los siguientes: una conductividad eléctrica de 2.91 mS cm^{-1} , un pH de 4.05, una viscosidad de 20 mPa s^{-1} y un contenido de sólidos solubles de 14.3 °Brix.

IV.1.2.2 Preparación del cultivo de *E. coli*.

El *Escherichia coli* CECT 516 (ATCC 8739) fue obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). Esta cepa se ha usado en anteriores estudios de PEAI en zumo de manzana y zumo de naranja-zanahoria (Evrendilek y col., 1999; Rodrigo y col., 2003 (a); Selma y col., 2004), comprobándose su habilidad para crecer en condiciones ácidas (Evrendilek y col., 1999). El cultivo se inoculó en “Nutrient Broth” (NB) (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España) y se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm durante 4 horas hasta obtener células en fase de crecimiento exponencial. Las células se centrifugaron dos veces a 5000 rpm y 4°C durante 15 min y resuspendidas en NB entre ambas centrifugaciones. Tras la segunda centrifugación, las células fueron resuspendidas en NB con un 20% de glicerol y se dispensaron en viales de 2 ml. Estos viales fueron inmediatamente congelados y almacenados a -80°C hasta la realización de las experiencias.

IV 1.2.3 Inoculación de las muestras.

La bebida se preparaba inmediatamente antes de realizar el tratamiento por PEAI. El zumo se filtraba y el tamaño de particular del zumo se ajustaba a 0.29 mm.

Una vez preparada, la bebida se inoculaba con el contenido de un vial previamente descongelado en frío hasta una concentración final de aproximadamente 10^6 CFU/ml. Posteriormente, las muestras inoculadas se trataban con los PEAI.

IV.1.2.4 Equipo de tratamiento por PEAI.

Todos los estudios realizados en el presente trabajo se han realizado con un equipo de PEAI OSU-4D (figura IV.1.1) perteneciente a la gama de equipos diseñados en la Universidad del Estado de Ohio (OSU).

Las prestaciones del equipo OSU-4D son las siguientes:

Régimen de trabajo: en continuo.

Tipo de pulsos: cuadrados, mono o bipolares.

Amplitud de pulso: de 1 a 20 kV/cm.

Frecuencia de pulsos: de 40 a 4000 pps.

Intensidad de campo eléctrico: un máximo de 40 kV/cm.

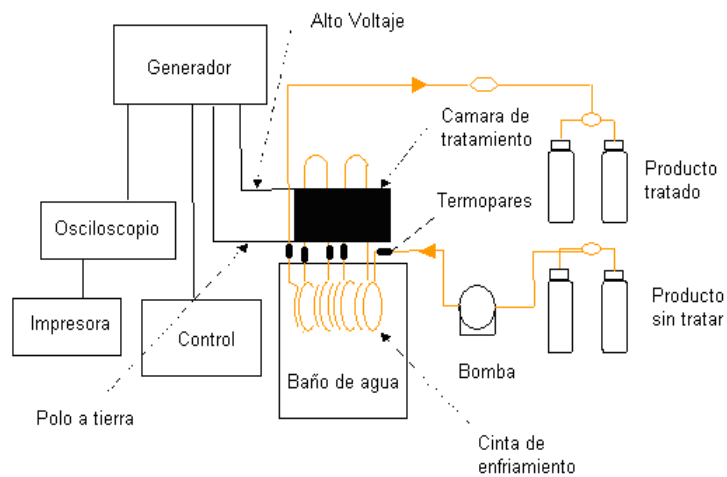


Figura IV.1.1 Equipo de PEAI OSU-4D en las instalaciones del IATA.

El equipo consta de:

- Un generador de voltaje que suministra un máximo de 12 kV.
- Una bomba que impulsa al alimento hacia las cámaras.
- Cámaras de tratamiento conectadas en serie de geometría del tipo co-field, adaptadas para el trabajo en continuo. El equipo puede trabajar con un máximo de 8 cámaras. Cada cámara está formada por dos electrodos de acero inoxidable, uno

conectado a tierra y el otro a la fuente de voltaje, y por un aislante (teflón) que los separa 0.293 mm (figura IV.1.2).

- Una serie de tubos que conectan dos pares de cámaras, como muestra la figura IV.1.2, cuya función es la refrigeración de la muestra.
- Un baño termostataado donde se introducen los tubos que conectan los pares de cámaras.
- Una serie de termopares conectados a las entradas y salidas de las cámaras, tal y como se muestra en la figura IV.1.2, que registran las temperaturas del alimento durante el proceso.
- Un osciloscopio que permite registrar el voltaje, la intensidad de corriente y la amplitud del pulso.

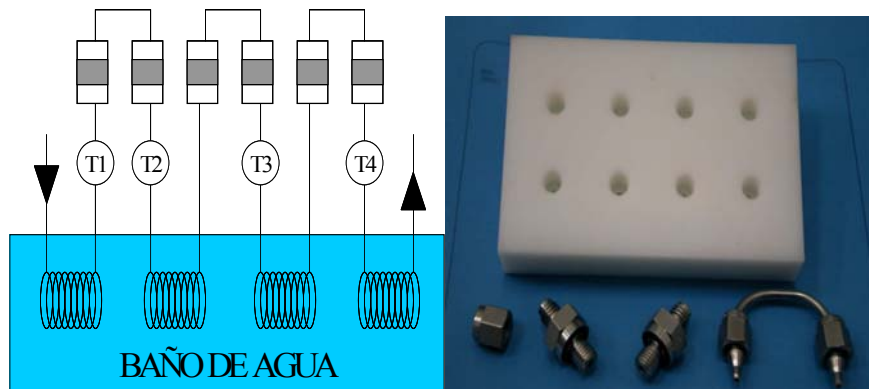


Figura IV.1.2 Esquema de la disposición de las cámaras, de los termopares y del sistema de refrigeración (izq.) y detalle de los electrodos y aislante que conforman las cámaras de tratamiento tipo co-field (dcha).

La figura IV.1.1 muestra el esquema general del equipo de PEAI tipo OSU-4D. El tratamiento básico por PEAI constaría de los siguientes pasos: 1) La muestra a tratar se coloca en el depósito suministrador refrigerado y en agitación continua; 2) A continuación la bomba impulsa la muestra hacia las cámaras de

tratamiento, pasando previamente por el baño termostatado; 3) Una vez alcanzado el régimen de trabajo, se conectaría el equipo, comenzando así el tratamiento; 4) La muestra es tratada por todas las cámaras, siendo refrigerada mediante el baño termostatado tras pasar por dos cámaras; 5) Durante el tratamiento, se registran las temperaturas mediante los termopares como el voltaje, la intensidad y la amplitud del pulso mediante el osciloscopio; 6) Recogida de la muestra en un depósito refrigerado.

El flujo de producto se ajustó a 60 ml/min mediante una bomba peristáltica (Millipore Corporation, Bedford, MA). Se aplicaron pulsos cuadrados bipolares de un ancho de 2.5 μ s. Las condiciones de los tratamientos por PEAI estudiados fueron: tiempo de tratamiento entre 0 y 700 μ s e intensidades de campo eléctrico de 15, 25, 35, y 40 kV/cm. La temperatura máxima de tratamiento alcanzada ha sido inferior a 55°C. Las experiencias se realizaron por triplicado.

IV 1.2.5 Recuento de células viables.

Las muestras tratadas y las muestras control se diluyen en serie en agua de peptona estéril tamponada al 0,1%, sembradas en placa en “Nutrient Broth Agar” (Scharlau, Spain), e incubadas durante 24 h a 37 °C.

La inactivación alcanzada por los tratamientos se ha expresado como el logaritmo decimal de la fracción de supervivientes ($\log S$) de *E. coli*. Por su parte, la fracción de supervivientes (S) se define como la proporción de la población de microorganismos tras el tratamiento (N) respecto de la población previa al tratamiento (N_0).

IV 1.2.6 Análisis estadístico.

Los tratamientos se realizaron por triplicado y los recuentos en placa se realizaron por duplicado. Los resultados se han expresado como media \pm desviación estándar. Los análisis de la varianza de los resultados se han realizado con el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

III.1.2.7 Modelos de inactivación de *E. coli* por PEAI.

Los datos experimentales se ajustaron a los siguientes modelos:

Modelo de Bigelow (Bigelow, 1921):

$$\text{Log}(S) = -\frac{t}{D} \quad (\text{Ec.IV.1.1})$$

donde S es la fracción de supervivientes a un tiempo de tratamiento t , y D es el tiempo de reducción, que matemáticamente es la inversa de la pendiente de la curva de supervivencia.

Modelo de Hülshager (Hülshager y col., 1981):

$$\text{Ln}(S) = -b \cdot (\text{Ln}(t) - \text{Ln}(t_{cH})) \quad (\text{Ec.IV.1.2})$$

donde b es el coeficiente de regresión, t es el tiempo de tratamiento y t_{cH} es el tiempo de tratamiento más largo para el cual la fracción de superviviente es 1.

Función de distribución de Weibull (Weibull, 1951):

$$\text{Ln}(S) = -\left(\frac{t}{a}\right)^n \quad (\text{Ec.IV.1.3})$$

donde a y n son los factores de escala y de forma, respectivamente. El factor n describe la forma de la curva de supervivencia y por eso cuando $n < 1$ la curva es cóncava hacia arriba, cuando $n > 1$ indica que es cóncava hacia abajo y si es $n = 1$ indica que es una línea recta en una escala logarítmica.

El valor $\overline{t_{cw}}$ puede ser definido para esta distribución como el tiempo de tratamiento en el cual se produce la mayor parte de la muerte del microorganismo y puede ser expresado con la siguiente ecuación (Peleg, 1999):

$$\overline{t_{cw}} = a * \Gamma(1 + n^{-1}) \quad (\text{Ec.IV.1.4})$$

La precisión del ajuste del modelo se evaluó mediante el análisis del Error Medio Cuadrático (MSE), que se define con la siguiente ecuación:

$$MSE = \frac{\sum(\text{predichos} - \text{observados})^2}{n-p} \quad (\text{Ec.IV.1.5})$$

donde n es el número de observaciones y p es el número de parámetros estimados por el modelo. Este valor representa una medida de la precisión y se calcula, primero, elevando al cuadrado el error individual en cada dato y entonces calculando la media o el valor medio de la suma de estos cuadrados (Ross, 1996). Cuanto menor sea el valor del MSE, mejor es el ajuste de los datos al modelo.

IV.1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La Figura IV.1.3 muestra las curvas de supervivencia para los tratamientos considerados en este estudio ($E = 15\text{--}40$ kV/cm; $t = 0\text{--}700$ μs). Como se puede observar, la población de *E. coli* se reduce un máximo de 3,83 ciclos logarítmicos cuando la bebida inoculada es tratada a 15 kV/cm durante 700 μs y una temperatura máxima de 55°C. La inactivación de *E. coli* obtenida en este estudio ha sido inferior a la alcanzada en tratamientos en zumo de naranja (Evrendilek y col., 1999, 2000; Heinz y col., 2003; McDonald y col., 2000) y similares a las obtenidas en leche (Grahl y col., 1996; Martín y col., 1997; Qin y col., 1995). Estos resultados pueden ser debido a un efecto protector en el *E. coli* de los componentes de la leche (Grahl y col., 1996; Ho y col., 1995; Martín y col., 1997).

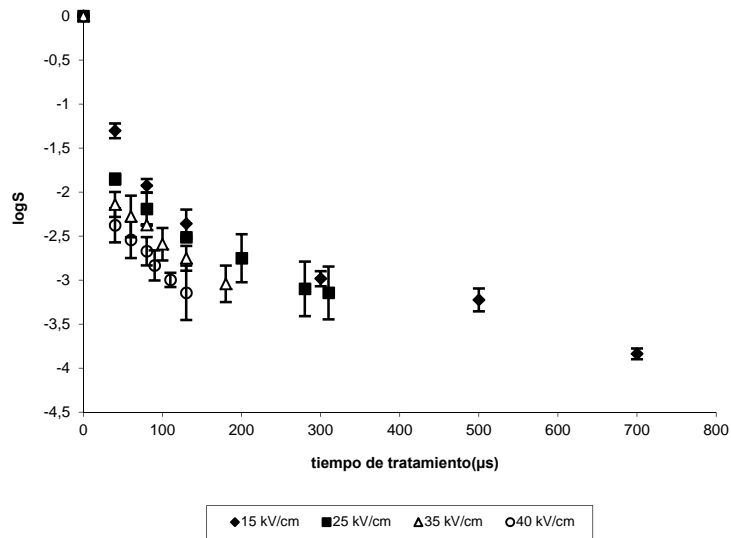


Figura IV.1.3. Curvas de supervivencia de *Escherichia coli* en una bebida de leche y zumo tratada a diferentes intensidades de campo eléctrico (ancho de pulso de 2,5 μs, pulsos cuadrados bipolares). Desviación estándar expresada como barras de error.

Como se puede observar, independientemente de la intensidad de campo eléctrico, al aumentar el tiempo de tratamiento disminuye la velocidad de inactivación ($p \leq 0,05$), implicando que las curvas de supervivencia no siguen una cinética log-lineal. La presencia de colas en las curvas de supervivencia es frecuente cuando se aplica la tecnología de los PEAI (Aronsson y Ronner, 2001; Raso y col., 2000; Rodrigo y col., 2003a).

Las curvas de supervivencia fueron modelizadas usando los modelos de Hulsheger y de Bigelow y la función de distribución de Weibull. La Tabla IV.1.1 muestra los parámetros obtenidos de los modelos usados. En el caso del modelo de Bigelow y la función de Weibull, los parámetros cinéticos D , $\overline{t_{cw}}$ y a disminuyen su

valor al aumentar la intensidad de campo eléctrico. Sin embargo, el valor de b del modelo de Hülshager no puede ser considerado como un índice de muerte para el *E. coli* ya que su valor no siempre decrece al aumentar la intensidad de campo.

Tabla IV.1.1. Parámetros \pm desviación estándar de los modelos de Bigelow, Hülshager y Weibull para las curvas de supervivencia de *E. coli*.

E(kV/cm)	Bigelow	Hülshager	
	D (μ s)	t_{cH} (μ s)	b
15	141,145 \pm 11,943	6,753 \pm 0,530	1,800 \pm 0,042
25	82,268 \pm 6,854	2,556 \pm 1,309	1,497 \pm 0,188
35	47,516 \pm 2,652	1,532 \pm 0,731	1,441 \pm 0,163
40	32,685 \pm 1,814	1,091 \pm 0,866	1,481 \pm 0,275

E(kV/cm)	Weibull		
	a	n	\overline{t}_{cw} (μ s)
15	0,684 \pm 0,236	0,310 \pm 0,015	5,358 \pm 0,693
25	0,171 \pm 0,055	0,266 \pm 0,015	2,803 \pm 0,065
35	0,130 \pm 0,083	0,247 \pm 0,063	1,984 \pm 0,555
40	0,014 \pm 0,013	0,186 \pm 0,066	1,595 \pm 0,986

Los valores de MSE (Tabla IV.1.2) ponen de manifiesto que el modelo que mejor describe las curvas de supervivencia es la función de distribución de Weibull (con valores de MSE más cercanos a 0), que es definido con dos parámetros, el factor de forma (n) y el factor de escala (a). El valor del factor de escala disminuye al aumentar la intensidad de campo eléctrico pudiéndose ser considerado entonces como una medida de la resistencia del microorganismo frente al tratamiento y por tanto, como un parámetro cinético.

Tabla IV.1.2. Valores de MSE para los modelos de Bigelow, Hülshager y Weibull.

E(kV/cm)	Bigelow	Hülshager	Weibull
15	1,16	0,04	0,13
25	0,76	0,36	0,25
35	0,51	0,16	0,09
40	0,45	0,24	0,08

También se puede observar que los valores de n siempre son inferiores a 1, indicando que la población microbiológica presenta una distribución de resistencias, reflejándose así una progresiva eliminación de los miembros más sensibles y sobreviviendo los más resistentes (Peleg y Cole, 2000). Al realizar un análisis de la varianza de los valores de n se observa que no existen diferencias significativas en sus valores para intensidades de campo comprendidas entre 25 kV/cm y 40 kV/cm ($p > 0,05$), por tanto el factor de forma es independiente de la intensidad de campo para ese rango. Este comportamiento del factor de forma también se ha observado en las curvas de supervivencia usando otras tecnologías de conservación (Chen y Hoover, 2004; Fernández y col., 2002; Heinz y Knorr, 1996) u otros alimentos (Rodrigo y col., 2003a).

Al ser n independiente de la intensidad de campo aplicada, el modelo de Weibull puede ser simplificado considerando el valor medio de n (0,233) para un rango de intensidades entre 25 y 40 kV/cm. De esta forma se obtuvo el siguiente modelo simplificado de Weibull:

$$\ln S = -(t/a)^{0,233} \quad (\text{Ec.IV.1.6})$$

Al ajustar los datos experimentales al modelo simplificado de Weibull se obtuvieron buenos ajustes para todas las intensidades de campo (Tabla IV.1.3) y similares a los obtenidos con el modelo completo de Weibull.

Tabla IV.1.3. Parámetros \pm desviación estándar y valores de MSE del modelo simplificado de Weibull para las curvas de supervivencia de *E. coli* ($25 \text{ kV/cm} \leq E \leq 40 \text{ kV/cm}$).

E (kV/cm)	a	\overline{t}_{cw} (μs)	MSE
25	0,067 \pm 0,003	2,533 \pm 0,126	0,243
35	0,046 \pm 0,002	1,730 \pm 0,126	0,097
40	0,029 \pm 0,004	1,090 \pm 0,092	0,127

Los valores de a obtenidos en el modelo simplificado (Tabla IV.1.3) disminuyen al aumentar la intensidad de campo (E) ($p \leq 0,05$). Además, se observa la existencia de una relación lineal entre a y E que permite obtener ecuaciones que relacionen los valores de a and $\log a$ con la intensidad de campo:

$$a = -0,0025E + 0,1306 \quad (R^2 = 0,9849) \quad (\text{Ec.IV.1.7})$$

$$\log a = -0,0232E + 0,5747 \quad (R^2 = 0,9421) \quad (\text{Ec.IV.1.8})$$

De igual modo que en los tratamientos por calor, se puede definir z_a como el incremento de la intensidad de campo eléctrico (E) requerido para alcanzar una reducción logarítmica en el valor del factor de escala:

$$Z_a = 1/\text{pendiente} = 43,1 \text{ kV/cm}$$

Álvarez et al. (2003b) también obtuvieron un valor de Z para tres cepas diferentes de *Salmonella* suspendidas en tampón citrato-fosfato y tratadas por PEAI.

Al sustituir la ecuación 7 en la ecuación 6 se obtiene una ecuación que puede ser usada para predecir inactivaciones para el rango de intensidades comprendidas entre 25y 40 kV/cm:

$$\ln S = -(t/(-(0,0025E + 0,1306)))^{0,233} \quad (\text{Ec.IV.1.9})$$

Otro posible parámetro a tener en cuenta es el valor de $\overline{t_{cw}}$. Se observa que los valores de $\overline{t_{cw}}$ del modelo simplificado (Tabla IV.1.3) disminuyen significativamente al aumentar la intensidad de campo aplicado ($p \leq 0,05$), por tanto, $\overline{t_{cw}}$ podría ser considerado como un parámetro cinético para el rango de 25 kV/cm a 40 kV/cm. Entonces, al sustituir la ecuación 7 en la ecuación 4 y asumiendo $n = 0,233$, se puede calcular $\overline{t_{cw}}$ a partir de la intensidad de campo eléctrico (ecuación 10).

$$\overline{t_{cw}} = (-0,0025E + 0,1306) * \Gamma(1 + 1/0,233) \quad (\text{Ec.IV.1.10})$$

Al definirse $\overline{t_{cw}}$ como el tiempo donde se produce la mayor parte de la muerte de los microorganismo, el uso de $\overline{t_{cw}}$ como parámetro cinético puede ser preferible frente a otros parámetros ya que se asocia de una forma más obvia la resistencia del microorganismo con el tiempo de tratamiento.

IV.1.4 CONCLUSIONES.

El tratamiento por PEAI inactiva al *Escherichia coli* suspendido en una bebida de zumo de naranja y leche. Tanto para la intensidad de campo como para el tiempo de tratamiento se ha observado la existencia de una correlación positiva con el nivel de inactivación.

Las curvas de supervivencia muestran que la inactivación microbiológica no sigue una cinética de primer orden. La función de distribución de Weibull es el modelo que mejor describe las curvas de supervivencia de E. coli en la bebida de zumo y leche. La obtención de una relación entre la inactivación de E. coli, considerado como microorganismo de referencia en zumo de naranja, la intensidad

de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, nos proporciona una poderosa herramienta que podría facilitar la introducción de esta tecnología a nivel industrial. Sin embargo, es bien conocido que cada microorganismo presenta una respuesta diferente a las condiciones de tratamiento y por tanto, sería interesante estudiar la validez del modelo de Weibull propuesto en otros microorganismos suspendidos en esta bebida.

IV.1.5 REFERENCIAS.

Anonymous. 1996. Confirmed *E. coli* cases in Oldwalla outbreak rise to 61, CDC says. Food Chem. News. November, 18:37.

Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., and Raso, J. 2003 (a). The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. International Journal of Food Microbiology. 87: 87-95.

Álvarez, I., Mañas, P., Condón, S., and Raso, J. 2003 (b). Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. Food Microbiology and Safety. 68 (7): 2316-2320.

Aronsson, K., and Ronner, U. 2001. Influence of pH, water, activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. Innovative Food Science and Engineering Technologies, 2(2): 105-112.

Barsotti, L., Dumay, E., Mu, T. H., Fernández, M. D., Cheftel, J. C. 2002. Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. Trends Food Sci. Technol. 12: 136-144.

Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V., and Martín, O. 2002. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. Trends Food Sci. Technol. 13(6/7):195-204.

Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barret, J. G. Wells and P. M. Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome

from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269:2217-2220.

Bigelow, W. D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 29: 528-536.

Cook, K. A.; Dobbs, T. E.; Hlady, W.G.; Wells, J. G.; Barret, T. J.; Puhr, N. D.; Lancette, G. A.; Bodager, D. W.; Toth, B. L.; Genese, C. A.; Highsmith, A. K.; Pilot, K. E.; Finelli, L.; and Swerdlow, D. L. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections with unpasteurized orange juice. *J. Am. Med. Assoc.* 280: 1504-1509.

Inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields. *World Journal of microbiology and biotechnology.* 18: 1-6 Damar, S., Bozoglu, F., Hizal, M., and Bayindirli, A. 2002.

Evrendilek, G. A., Zhang, Q. H., and Richer, E. R. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* 8739 in apple juice by pulsed electric fields. *J. Food Prot.* 62(7): 793-796.

Evrendilek, G.A., Jin, Z.T., Ruhlman, K.T., Qiu, X., Zhang, Q.H., & Richter, E.R. (2000). Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(1), 77-86.

Fernandez, A., Collado, J. , Cunha, L. M., Ocio, M. J., and Martínez, A. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 147-153.

Grahl, T., and Märkl, H. 1996. Killing of micro-organisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 45: 148-157.

Heinz, V. and Knorr, D. 1996. High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnol.* 10:149-161.

Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 167-175.

Ho, S. Y., Mittal, G. S., Cross, J. D., and Griffiths, M. W. 1995. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science.* 60: 1337-1340.

Hülshager, H., Potel, J. and Niemann, E. G. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.* 20: 53-65

Jung, Shin, K. J., Ha, J. K., Cho, K. Y., Pyun, H. Y., and Ryang, Y. 2000. Pasteurization of milk by pulsed electric fields in a continuous system. *Book of Abstracts. ICEF.*

Lebovka, N. I., and Vorobiev, E. 2004. On the origin of the deviation from the first-order kinetics in inactivation of microbial cells by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology.* 91: 83-89.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., and Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology.* 72, 107-112.

Martín, O., Swanson, B. G., Chang, F. J., Qin, B. L., and Barbosa-Cánovas, G. V. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering.* 20: 317-336.

McDonald, L. C., Lloyd, S.W., Vitale, M. A., Petersson, K., and Innings, F. 2000. Effects of pulsed on microorganisms in orange juice using electric fields of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science.* 65 (6): 984-989.

Parish, M. E. 1997. Public health and non-pasteurized fruit juices. *Crit. Rev. Microbiol.* 23:109-119.

Peleg, M. 1999. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*. 32, 271-278.

Peleg, M. and Cole, M. B. 2000. Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments. *J. Food Saf.* 16: 287-299.

Pothakamury, U. R., Monsalve-González, A., and Barbosa-Cánovas, G. 1995. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric fields technology. *J. Food Research*, 28(2): 167.

Qin, B. L., Pothakamury, U. R., Vega –Mercado, H., Martín-Belloso, O. M., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1995 (a). Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.* 12: 55-60.

Qin B. L., Pothakamury U. R., Barbosa-Canovas G. V., and Swanson B. G. 1996. Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36(6):603-627.

Raso, J., Calderón, M. L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G. V., and Swanson, B.G. 1998. Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. *Journal of Food Science*. 63 (6): 1042-1044.

Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., and Sala Trepas, F. J. 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 1: 21-29.

Rodrigo, D., Martínez, A., Harte, F., Barbosa-Cánovas, G. V., and Rodrigo, M. 2001. Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange-carrot juice by means of pulsed electric fields: Comparison of inactivation models. *Journal of Food Protection*. 64(2): 259-263.

Rodrigo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A., and Rodrigo, M. 2003 (a). Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields. *J. Food Prot.* 66 (6): 1007-1012.

Rodrigo, D., Ruíz, P., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A., and Rodrigo, M. 2003 (b). Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*. 81: 223-229.

Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bact.* 81: 501-508.

Selma, M. V., Salmerón, M. C., Valero, M., and Fernández, P. S. 2004. Control of *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli* by pulsed fields in MRS Broth, Nutrient Broth and orange- carrot juice. *Food Microbiology*. 21: 519-525.

Sivapalasingam, S.; Friedman, C. R., Cohen L., and Tauxe, R. V. 2004. Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67(10):2342-2353.

U.S. Department of Health and Human Services (USDHHS), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice – United States and Canada. June 1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48: 525-585.

Weibull, W. 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *J. Appl. Mech.* 51: 293-297.

Wouters, P. C., Dutreux, N., Smelt, J. P. P. M., and Lelieveld, H. L. M. 1999. Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12): 5364-5371.

Yeom, H. W.; Streaker, C. B.; Zhang, Q. H.; Min D. B. 2000. Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4597-4605.

**CAPÍTULO 2: Parámetros cinéticos en la
inactivación por PEAI de *Saccharomyces
cerevisiae*: Efecto de la temperatura**

IV.2.1 INTRODUCCIÓN.

Debido a las características propias de los zumos de cítricos (bebidas ácidas con alto contenido en azúcar), la microbiota típica presente consta principalmente de bacterias ácido lácticas y de hongos y levaduras. Aunque las bacterias acidófilas es la flora más importante presente en zumos de cítricos, las levaduras son más tolerantes a las altas temperaturas (65-70°C), conservantes, bajas temperaturas y presiones osmóticas que los hongos o las bacterias (Kimball 1999), destacando el *Saccharomyces cerevisiae* como levadura más frecuentemente presente en zumo de cítricos pasteurizado (Parish 1988).

El desarrollo de modelos que interpreten las curvas de supervivencia de microorganismos es esencial para una futura implantación a nivel industrial de productos tratados por PEAI. Estos modelos proporcionan parámetros que informan sobre la resistencia de los microorganismos a la tecnología, y la ausencia de estos parámetros impiden una correcta comparación de los estudios que aparecen en la literatura, tal y como afirma la “National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2006). Numerosos estudios han mostrado que las curvas de supervivencia no siempre pueden ser explicadas mediante modelos cinéticos de primer orden, ajustándose mejor a modelos diferentes a los de primer orden, tales como las distribuciones log-logístico o de Weibull entre otras (Álvarez y col. 2003a, 2003b; Pataro y col., 2011; Peleg 1999; Pina y col., 2009; Rivas y col. 2006b; Rodrigo y col. 2001).

Sin embargo, para una implantación industrial no es solo necesario calcular parámetros primarios y secundarios sino también cómo se ven influenciados estos parámetros a variaciones de factores ambientales, como el pH, la actividad de agua y la temperatura entre otros. Una estrategia para incrementar la efectividad de los PEAI es su combinación con temperaturas suaves (Sepúlveda y col., 2005; Vega-Mercado y col., 1996). Se ha comprobado que la temperatura que se alcanza con el tratamiento se ve influenciada por la temperatura de entrada del alimento. De

hecho, diversos estudios han mostrado que existe un efecto positivo entre el incremento de temperatura de entrada y la eficacia del tratamiento por PEAI (Korolczuk y col., 2006; Liang y col., 2002; Sensoy y col., 1997; Sampredo y col., 2006; Sampredo y col., 2009; Walkling-Ribeiro y col., 2009). Por tanto, la temperatura de entrada del alimento podría ser un parámetro a tener en cuenta desde un punto de vista de los APPCC para una futura implantación industrial de esta tecnología. Sin embargo no existen estudios que expliquen en profundidad las variaciones de los parámetros cinéticos al variar la temperatura de entrada del alimento.

Los objetivos del presente estudio fue investigar el efecto de la temperatura de entrada en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* suspendido en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche, obtener modelos matemáticos que expliquen satisfactoriamente las curvas de supervivencia y estudiar el efecto de la temperatura de entrada en los valores de los parámetros cinéticos obtenidos.

IV.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.2.1 Preparación de la bebida.

La preparación de la bebida se preparó según el protocolo descrito en el ANEXO 1.

Los resultados de los análisis físico-químicos fueron los siguientes: una conductividad eléctrica de 2,91 mS/cm, un pH de 4,05, una viscosidad de 20 mPa/s y un contenido de sólidos solubles de 14,3 °Brix.

La bebida se filtró con un tamiz metálico ajustándose el tamaño de partícula a un máximo de 0,29 mm. La bebida se inoculó con el contenido de un vial descongelado de 2 ml de *S. cerevisiae* hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 10^6 CFU/ml.

IV.2.2.2 Preparación del cultivo de *S. cerevisiae*.

El *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1319 (ATCC 26602) fue obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). El cultivo se inoculó en “Yeast Malt Agar” (YMA) (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España) y se incubó a 27 °C con agitación continua a 200 rpm durante 24 h hasta obtener células en estado estacionario de crecimiento. Las células se sometieron a un proceso de lavado y concentrado. Para ello se centrifugaron dos veces a 3.826 g y 4 °C durante 15 min, resuspendiéndose en YMA entre las centrifugaciones. Al finalizar la segunda centrifugación, las células se resuspendieron en YMA con un 20% de glicerol y se dispensaron en viales de 2 ml. Inmediatamente, los viales se congelaron y almacenaron a -80°C hasta la realización de las experiencias (Ananta y col. (2001), De Paoli (2005)).

IV.2.2.3 Tratamiento térmico.

Se llevaron a cabo ensayos de inactivación térmica por duplicado usando una adaptación del micro-método de Stern y Proctor (1954). Las células inoculadas en la bebida a una concentración de aproximadamente 10^6 CFU/ml se inyectaron en tubos capilares de 0,01 ml. Los tubos fueron sellados acercando ambos extremos a una llama de oxígeno y se calentaron en un baño agitador de aceite. Para cada combinación de temperatura (35 y 55 °C) y tiempo (de 0 a 180 s) se prepararon cuatro tubos capilares. Tras el tratamiento, los tubos capilares se enfriaron en un baño de agua/hielo, se lavaron en una solución de jabón, se enjuagaron con agua destilada estéril y se sumergieron en etanol al 70%.

IV.2.2.4 Equipo de tratamiento por PEAI.

El equipo de PEAI utilizado se ha descrito en el apartado IV.1.2.4.

La temperatura de tratamiento máxima alcanzada durante las experiencias ha sido inferior a 55°C, manteniéndose a esa temperatura un tiempo inferior a 2 s.

El flujo de producto se ajustó a 60 ml/min mediante una bomba peristáltica (Millipore Corporation, Bedford, MA). Se aplicaron pulsos cuadrados bipolares de un ancho de 2.5 μ s. Las condiciones de los tratamientos por PEAI estudiados fueron: tiempo de tratamiento entre 0 y 1900 μ s, temperaturas de entrada de 10 y 32°C, e intensidades de campo eléctrico de 10, 20, 30, and 40 kV/cm. Las experiencias se realizaron por triplicado.

La energía aplicada (Q) se calculó mediante la ecuación utilizada por Abram y col. (2003), Min y col. (2003), y Pérez y Pilosof (2004):

$$Q \text{ (J/m}^3\text{)} = E^2\sigma t \quad (\text{Ec.IV.2.1})$$

donde E es la intensidad de campo eléctrico (V/m), σ es la conductividad eléctrica del producto (S/m) calculada para cada temperatura de procesado y t es el tiempo de tratamiento (s).

IV.2.2.5 Recuento de células viables.

Las muestras tratadas y las muestras control se diluyen en serie en agua de peptona estéril tamponada al 0,1%, sembradas en placa en “Yeast Malt Agar” (Scharlau, España), e incubadas durante 72 h a 27 °C.

La inactivación alcanzada por los tratamientos se han expresado como el logaritmo decimal de la fracción de supervivientes ($\log S$) de *S. cerevisiae*. Por su parte, la fracción de supervivientes (S) se ha definido como la proporción de la población de microorganismos tras el tratamiento (N) respecto de la población previa al tratamiento (N_0).

IV.2.2.6 Análisis estadístico.

Los tratamientos se realizaron por triplicado y los recuentos en placa se realizaron por duplicado. Los resultados se han expresado como media \pm desviación estándar. Los análisis de la varianza de los resultados se han realizado con el software Statgraphics Centurion XV 15.1.03 (Statistical Graphics Corp.).

Un modelo cinético bifásico (Ec.IV.2.2) representa la presencia de dos fracciones microbiológicas con diferentes resistencias al tratamiento, una de ellas estable (S) y la otra lábil (L), y ambas siendo inactivadas de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$S = S_L \cdot \exp(-k_L \cdot t) + S_S \cdot \exp(-k_S \cdot t) \quad (\text{Ec.IV.2.2})$$

donde S representa la fracción de supervivencia para un tiempo de tratamiento (t), S_L and S_S las fracciones de supervivientes lábil y estable respectivamente, y k_L y k_S las constantes de inactivación para las fracciones lábil y estable.

La herramienta BestFit 4.5 (Palisade Corporation, Newfield, N.Y.) se ha usado para encontrar la distribución de densidad que mejor se ajusta a los datos experimentales de inactivación, expresados como fracción de supervivientes.

$$S = \frac{N}{N_0} \quad (\text{Ec.IV.2.3})$$

donde N_0 and N son los recuentos de células viables antes y después de cada tratamiento.

Esta herramienta permite ajustar hasta 20 distribuciones a los datos experimentales, siendo el “Error Cuadrático Medio” (MSE) el parámetro usado para comparar el ajuste de las diferentes distribuciones. El MSE se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$MSE = \frac{\sum_1^n |(predicho - observado)|^2}{n - p} \quad (\text{Ec.IV.2.4})$$

donde n es el número de observaciones y p es el número de parámetros que se estimarán por el modelo. A menor valor de MSE mejor es el ajuste del modelo.

Para calcular los valores de los parámetros de las distribuciones, las funciones de distribución se ajustaron a los datos experimentales mediante regresiones no lineales llevadas a cabo con el software Statgraphics Centurion XV 15.1.03 (Statistical Graphics Corp.).

IV.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

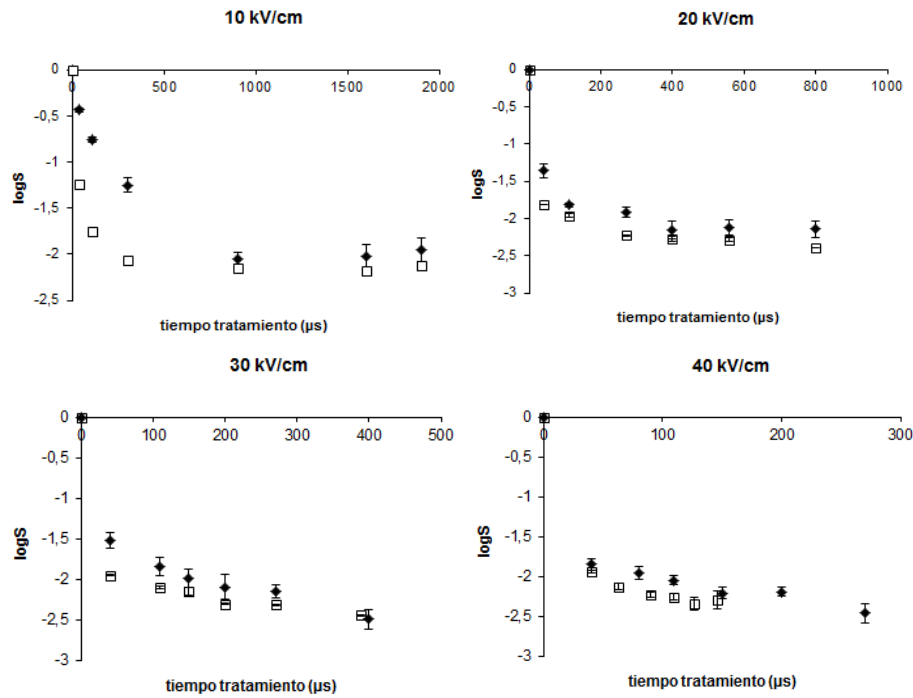
IV.2.3.1 Efecto de la tecnología de los PEAI sobre el *S. cerevisiae*.

Figura IV.2.1. Curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* en una bebida de leche y zumo a diferentes intensidades de campo eléctrico y temperaturas de entrada (◆ 10 °C; □ 32 °C) (ancho de pulso de 2.5 μs, pulsos cuadrados bipolares). Desviación estándar expresada como barras de error.

La Figura IV.2.1 muestra las curvas de supervivencia obtenidas por los tratamientos realizados en este estudio ($E = 10 - 40$ kV/cm; $t = 0 - 1900$ μs; temperatura de entrada = 10 and 32 °C). En general, independientemente de la intensidad de campo eléctrico y de la temperatura de entrada, al incrementarse el tiempo de tratamiento disminuye la velocidad de inactivación. De hecho, las curvas

de supervivencia no siguen una cinética lineal, habiendo una inactivación más rápida a tiempos cortos de tratamiento. La presencia de colas en las curvas de supervivencia es un hecho común en muestras tratadas por esta tecnología, lo cual significa que existe una distribución de resistencias a los PEAI en la población de *S. cerevisiae* (Aronsson y Rönner 2001; Pina y col., 2007; Pina y col., 2009; Rodrigo y col. 2001; San Martín y col., 2007).

Tabla IV.2.1. Inactivación de *S. cerevisiae* (reducciones logarítmicas \pm desviación estándar) y máxima temperatura de salida alcanzada variando la intensidad de campo eléctrico y la temperatura de entrada para tiempos de tratamiento de 40 y 110 μ s.

t (μ s)	E (kV/cm)	Log S		Temperatura Máxima de Tratamiento ($^{\circ}$ C)	
		10 $^{\circ}$ C	32 $^{\circ}$ C	10 $^{\circ}$ C	32 $^{\circ}$ C
40	10	0,44 \pm 0,02	1,25 \pm 0,01	9	34,2
	20	1,36 \pm 0,09	1,82 \pm 0,01	10,6	35,6
	30	1,52 \pm 0,09	1,95 \pm 0,01	11,6	36,2
	40	1,85 \pm 0,07	1,95 \pm 0,02	13,5	38,2
110	10	0,76 \pm 0,03	1,75 \pm 0,02	10	35,2
	20	1,82 \pm 0,03	1,96 \pm 0,02	12,6	38,4
	30	1,84 \pm 0,11	2,11 \pm 0,02	15,2	40,8
	40	2,05 \pm 0,07	2,26 \pm 0,04	20,6	43,5

Independientemente de la intensidad de campo aplicada, al incrementar la temperatura de entrada de 10 a 32 $^{\circ}$ C (alcanzándose temperaturas máximas de salida de 33 $^{\circ}$ C y 55 $^{\circ}$ C, respectivamente) se produce un incremento de la inactivación ($p \leq 0,05$). La Tabla IV.2.1 muestra por una parte los niveles de inactivación alcanzados para tiempos de tratamiento de 40 y 110 μ s en todas las intensidades de campo y temperaturas de entrada (10 and 32 $^{\circ}$ C), y por otra parte las temperaturas máximas alcanzadas en cada caso.

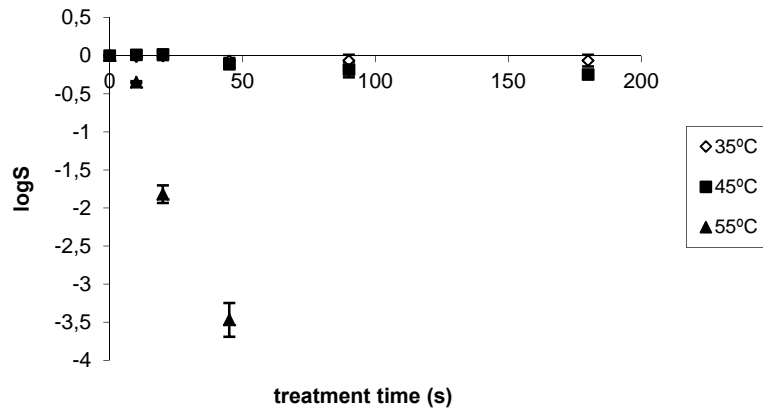


Figura IV.2.2. Curvas de supervivencia isotérmicas de *S. cerevisiae* en una bebida de leche y zumo..

Para comprobar si la temperatura por si misma puede tener un rol en la inactivación alcanzada, se realizaron estudios de termorresistencia realizados a 35, 45 y 55°C (figura IV.2.2). Como se observa en las curvas de supervivencia de la figura, a los 10 s de tratamiento no se observa inactivación para las temperaturas de 35 y 45°C, siendo inferiores a 0,5 ciclos logarítmicos para 55°C. Estos resultados muestran que, en los tratamientos por PEAI, la inactivación debida al calor es despreciable y probablemente no justifican el incremento de la inactivación alcanzada al aumentar la temperatura de entrada de 10°C a 32°C. Consecuentemente se podría hablar de la existencia de un efecto sinérgico, entre los PEAI y la temperatura, como causa del incremento del nivel de inactivación.

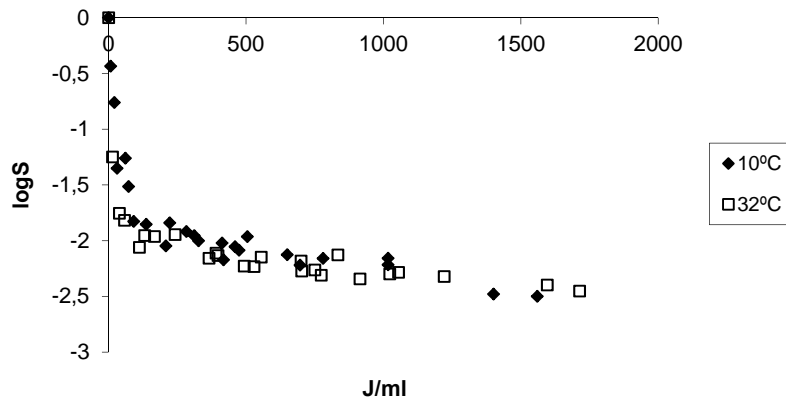


Figura IV.2.3. Influencia de la energía aplicada y la temperatura de entrada en la inactivación de *S. cerevisiae* por PEAI en una bebida de leche y zumo.

Para estudiar el posible efecto sinérgico en profundidad, los datos de inactivación se analizaron desde un punto de vista energético, ya que para realizar el cálculo energético se tiene en cuenta parámetros tecnológicos como la intensidad de campo eléctrico, tiempo de tratamiento y la conductividad eléctrica que depende para un mismo producto de la temperatura. Al representar el logaritmo de la fracción de supervivientes frente a la energía aplicada (figura IV.2.3) se observa la existencia de dos poblaciones de *S. cerevisiae* con diferentes niveles de resistencia al tratamiento por PEAI para ambas temperaturas de entrada (10 y 32 °C). Al ajustar un modelo bifásico (Ec.IV.2.2) es posible identificar ambas fracciones de población en las dos temperaturas estudiadas, siendo la fracción lábil de $0,9845 \pm 0,042$ cfu/mL, que corresponde a un valor de Q de 111×10^6 J/m³. Por otra parte se calcularon los valores de las constantes cinéticas de la fracción lábil (k_L) y de la fracción estable (k_S) para ambas temperaturas (tabla IV.2.2). Un análisis de la

varianza de los resultados anteriores mostró la existencia de diferencias significativas entre los valores de k_L en función de la temperatura de entrada, mientras que la k_S no presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$). En otras palabras, para un nivel de energía igual o inferior a $111 \times 10^6 \text{ J/m}^3$, se producen diferencias en los niveles de inactivación de *S. cerevisiae* dependiendo de la temperatura de entrada, siendo mayores a 32°C que a 10°C . Esta dependencia confirma la existencia de un efecto sinérgico tratamiento PEAI – temperatura para valores de Q inferiores a $111 \times 10^6 \text{ J/m}^3$. Sin embargo, la inactivación alcanzada para valores superiores a $111 \times 10^6 \text{ J/m}^3$ sigue una misma tendencia independientemente de la temperatura de entrada ($p \leq 0.05$), mostrando, por tanto, una inexistencia de efecto sinérgico.

Tabla IV.2.2. Parámetros \pm desviación estándar obtenidos del ajuste de los datos de inactivación frente a Q en el modelo bifásico (Ec.IV.2.2).

Temperatura de entrada	10 °C	32 °C
k_L	0,1218 \pm 0,0066 ^{1a}	0,2110 \pm 0,0008 ^b
k_S	0,0006 \pm 0,0002 ^c	0,0008 \pm 0,0003 ^c

¹ Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

IV.2.3.2 Modelización de las curvas de supervivencia del *S. cerevisiae*.

La modelización de las curvas de supervivencia de microorganismos ha llegado a ser una herramienta esencial para garantizar la seguridad de alimentos procesados además de un etapa intermedia en el análisis de riesgos. Tradicionalmente los valores D y z han sido ampliamente utilizados en el tratamiento térmico, asumiendo que la cinética de primer orden era el modelo que

mejor describía la inactivación de microorganismos. Sin embargo, es bastante frecuente, tanto en tratamientos térmicos como con otros métodos de inactivación, encontrarse curvas de supervivencia que realmente no parece obedecer a cinéticas de primer orden. Una manera de explicar este patrón de inactivación es considerar la letalidad como un suceso probabilístico (Peleg 1999; Peleg 2000a,b; Peleg y Cole 1998; Peleg y Cole 2000). Estos autores consideran que, debido a la heterogeneidad de las células en una población de un microorganismo, habrá una distribución de tiempos de inactivación que puede ser explicado satisfactoriamente con cinéticas diferentes a las de primer orden. En este estudio, la herramienta “best-fit”@Risk 4.5 (Palisade Corporation, Newfield, N.Y.) se usó para encontrar la distribución que mejor se ajustó a los datos experimentales. De acuerdo con el análisis realizado mediante dicha herramienta, la función de distribución de Weibull es la distribución que mejor se ajustaba a los datos experimentales (Tabla IV.2.3). Numerosos autores han comprobado que Weibull es la distribución que mejor se ajusta a los datos de inactivación (Aronsson y Rönner 2001; Pina y col., 2007; Rodrigo y col. 2001; Rivas y col., 2006; Sampedro y col., 2011; San Martín y col., 2007). Por otra parte, la elección final de la mejor distribución debe obedecer al principio de parsimonia o “Ockham’s razor” (Ratkowsky 1990), que incide en la elección del modelo con el menor número posible de parámetros para representar los datos (Van Boekel 2002). Aparte que la distribución Log-logístico es la segunda distribución que mejor ajuste proporciona, es menos atractiva que Weibull en términos de principio de parsimonia, ya que es más compleja al tener dicha distribución más parámetros que la de Weibull.

Tabla IV.2.3. Valores de MSE y rango de las distribuciones que mejor se ajustan proporcionadas por la herramienta “best fit” de @Risk 4.5 best fit tool (Palisade Corporation, Newfield, N.Y.) para los datos de inactivación por PEAI de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas de entrada ((a) 10 °C; (b) 32 °C).

(a)

Función de distribución	10 kV/cm		20 kV/cm		30 kV/cm		40 kV/cm	
	MSE	Rank	MSE	Rank	MSE	Rank	MSE	Rank
Weibull	8,22x10 ⁻⁷	7	4,26x10 ⁻⁸	1	1,2x10 ⁻⁷	1	2,17x10 ⁻⁷	1
Log-Logistic	3,51x10 ⁻⁹	1	1,05x10 ⁻⁷	2	2,08x10 ⁻⁷	2	5,29x10 ⁻⁷	6
Log-Normal	4,26x10 ⁻⁹	2	1,76x10 ⁻⁷	3	2,25x10 ⁻⁷	4	4,79x10 ⁻⁷	5
Exponencial	1,13x10 ⁻⁷	4	3,85x10 ⁻⁷	6	2,75x10 ⁻⁷	7	3,43x10 ⁻⁷	2
BetaGeneral	1,46x10 ⁻⁶	12	1,08x10 ⁻⁶	8	1,03x10 ⁻⁶	10	7,61x10 ⁻⁷	8

(b)

Función de distribución	10 kV/cm		20 kV/cm		30 kV/cm		40 kV/cm	
	MSE	Rank	MSE	Rank	MSE	Rank	MSE	Rank
Weibull	1,35x10 ⁻⁷	9	6,89x10 ⁻⁸	1	3,07x10 ⁻⁷	2	7,37x10 ⁻⁶	3
Log-Logistic	4,02x10 ⁻⁸	2	1,62x10 ⁻⁷	6	6,87x10 ⁻⁷	7	1,37x10 ⁻⁵	7
Log-Normal	1,01x10 ⁻⁷	10	1,62x10 ⁻⁷	5	6,28x10 ⁻⁷	6	1,30x10 ⁻⁵	6

La forma acumulativa de la función de distribución de Weibull puede ser expresada como la Ec.IV.2 5, que es definida con un factor de escala (a) y un factor de forma (n). De acuerdo con este modelo, la forma de la curva semilogarítmica es determinada por n , por eso cuando $n < 1$ la curva de supervivencia es cóncava hacia arriba, si $n > 1$ indica que la curva es cóncava hacia abajo, y si $n = 1$ la curva es una línea recta (Peleg 1999).

$$Ln(S) = -\left(\frac{t}{a}\right)^n \quad (\text{Ec.IV.2.5})$$

Tabla IV.2.4. Evaluación del modelo de Weibull y efecto de la intensidad de campo eléctrico y la temperatura de entrada en el factor de forma.

E (kV/cm)	10 °C		32 °C	
	n	MSE	n	MSE
10	0,3344±0,0097 ^a	0,1465	0,1106±0,0055 ^c	0,1420
20	0,1345±0,0018 ^b	0,0794	0,1031±0,0038 ^c	0,0166
30	0,1365±0,0029 ^b	0,0782	0,1037±0,0041 ^c	0,0195
40	0,1292±0,0050 ^b	0,0478	0,1106±0,0058 ^c	0,0339

^{a,b,c} Letras diferentes implica diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

En la Tabla IV.2.4 se muestran los valores del factor de forma y los MSE del modelo de Weibull. Se puede observar que los valores de n son siempre inferiores a 1, indicando que la población microbiana sigue una distribución que muestra la progresiva eliminación de los miembros más sensibles y sobreviviendo las más resistentes (Peleg 2000a). Al realizar un ANOVA del factor de forma se observa que el valor de n es independiente de la intensidad de campo para las curvas de supervivencia para una temperatura de entrada de 32 °C ($p \leq 0,05$), y en el caso de las curvas para 10 °C solo la curva de 10 kV/cm da un valor de n estadísticamente diferente. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores cuando se estudió el efecto de los PEAI en zumo de naranja-zanahoria (Rodrigo y col. 2003) o en una bebida de zumo de naranja y leche (Rivas y col. 2006b). A partir del análisis estadístico se comprueba que el valor de n depende de la temperatura de entrada, siendo menores los valores y por tanto las curvas presentan una mayor cola al incrementar la temperatura de 10 a 32 °C ($p \leq 0,05$) (figura IV.2.2). Estos resultados muestran la dependencia del factor de forma de los factores externos como es el caso de la temperatura de entrada. Rodrigo y col. (2003) estudiaron el efecto combinado de la intensidad de campo y la variación de la proporción de naranja/zanahoria sobre la resistencia de *L. plantarum* a los PEAI, observando la

dependencia del factor de forma de Weibull respecto de la proporción de naranja/zanahoria. Estos resultados están de acuerdo con los expuestos por otros autores (Peleg y Cole 1998; Van Boekel 2002), que inciden en la influencia del pH, la fuerza iónica y la concentración de ciertos compuestos en el factor de forma en muestras tratadas térmicamente.

Como el parámetro n es independiente de la intensidad de campo eléctrico, se ajustó de nuevo el modelo de Weibull, pero esta vez con valores medios de n : 0,1334 en el rango de 20 a 40 kV/cm para 10 °C, y 0,1070 para todas las intensidades de campo a 32°C. La Tabla IV.2.5 muestra los valores de los parámetros de Weibull recalculados para los valores medios de n . Se puede observar que los valores de MSE obtenidos en el modelo simplificado de Weibull son del mismo rango que los obtenidos para el modelo completo. El valor del factor de escala (a) está comprendido entre $2,16 \times 10^{-5}$ y $17,22 \mu\text{s}$, disminuyendo al aumentar la intensidad de campo y la temperatura de entrada ($p \leq 0.05$), viéndose, por tanto, afectado por las condiciones ambientales. Por tanto, el factor de escala puede ser considerado como una medida de la resistencia del microorganismo al tratamiento, también llamado parámetro cinético.

Se ha observado una relación lineal entre el factor de escala y la intensidad de campo eléctrico tanto para 10 °C como para 32 °C. Las ecuaciones Ec.IV.2.7 y Ec.IV.2.8 se han obtenido por medio de regresiones lineales con el logaritmo de a como variable dependiente:

$$\log a = -1,7616 - 0,0325E \quad R^2 = 0,99 \quad (10 \text{ °C}) (20 \leq E \leq 40) \quad (\text{Ec.IV.2.7})$$

$$\log a = -3,1700 - 0,0396E \quad R^2 = 0,94 \quad (32 \text{ °C}) (10 \leq E \leq 40) \quad (\text{Ec.IV.2.8})$$

Las relaciones obtenidas en las ecuaciones anteriores se introdujeron en la función de distribución de Weibull simplificada (Ec.IV.2.5), obteniéndose un modelo global para cada temperatura de entrada:

Tabla IV.2.5. Parámetros \pm desviación estándar y MSE del modelo simplificado de Weibull para las curvas de supervivencia de *S. cerevisiae*.

10 °C				
E (kV/cm)	a (μs)	n	t_{cw} (μs)	MSE
10	17,2253 \pm 1,9255	0,3344	104,91 \pm 13,51	0,1465
20	3,98 $\times 10^{-3}$ \pm 6,04 $\times 10^{-4}$	0,1334	55,40 \pm 8,40	0,0749
30	1,74 $\times 10^{-3}$ \pm 4,29 $\times 10^{-4}$	0,1334	24,17 \pm 5,97	0,0667
40	8,90 $\times 10^{-4}$ \pm 1,17 $\times 10^{-4}$	0,1334	12,40 \pm 1,64	0,0378

32 °C				
E (kV/cm)	a (μs)	n	t_{cw} (μs)	MSE
10	3,56 $\times 10^{-4}$ \pm 2,22 $\times 10^{-5}$	0,1070	283,36 \pm 17,73	0,1251
20	7,75 $\times 10^{-5}$ \pm 3,95 $\times 10^{-6}$	0,1070	61,66 \pm 3,14	0,0163
30	3,86 $\times 10^{-5}$ \pm 2,36 $\times 10^{-6}$	0,1070	30,79 \pm 1,88	0,0188
40	2,16 $\times 10^{-5}$ \pm 1,64 $\times 10^{-7}$	0,1070	17,08 \pm 1,30	0,0334

$$\ln S = - \left[\frac{t}{\exp(\alpha + \beta * E)} \right]^{0,1334} \quad (10 \text{ °C}) \quad (20 \leq E \leq 40) \quad (\text{Ec.IV.2.9})$$

$$\ln S = - \left[\frac{t}{\exp(\gamma + \delta * E)} \right]^{0,1070} \quad (32 \text{ °C}) \quad (10 \leq E \leq 40) \quad (\text{Ec.IV.2.10})$$

Para mejorar la estimación de los parámetros, todos los datos experimentales fueron ajustados a las ecuaciones Ec.IV.2.9 y Ec.IV.2.10 mediante regresiones no lineales. La realización de este análisis mejora la precisión de la estimación porque así se evitan los posibles errores debido a la estimación de parámetros intermedios y porque se usan todos los datos experimentales para estimar los parámetros

(Fernández y col. 2002). Los parámetros estimados y los intervalos de confianza se muestran en la tabla IV.2.6.

Para determinar la bondad del ajuste, se calcularon los valores de MSE comparando los datos experimentales con los predichos, obteniéndose 0,0847 para 10 °C y 0,0699 para 32 °C, indicativos de un buen ajuste.

Tabla IV.2.6. Parámetros estimados obtenidos al ajustar los modelos globales (Ec.IV.2.8 and Ec.IV.2.9) al total de los datos experimentales.

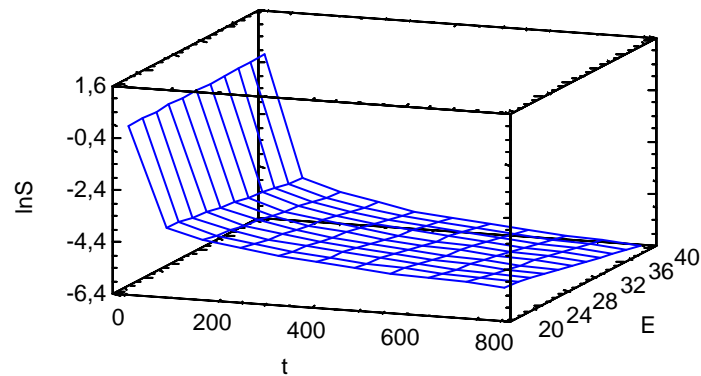
Temperatura de entrada	Parámetro	Estimación
10 °C(20<E<40)	α (μ s)	-1,7969 \pm 0,1630
	β (μ s·cm/kV)	-0,0325 \pm 0,0051
32 °C(10<E<40)	γ (μ s)	-3,1472 \pm 0,0612
	δ (μ s·cm/kV)	-0,0395 \pm 0,0021

La Figura IV.2.4 muestra las superficies de respuesta obtenida a partir del modelo global. En ella se representa el logaritmo natural de la fracción de supervivientes en función del tiempo de tratamiento y la intensidad de campo eléctrico para cada temperatura de entrada. Para ambas temperaturas e independientemente de la intensidad de campo, ambas superficies muestran, para tiempos cortos de tratamiento, un rápido incremento de la inactivación, ralentizándose la inactivación a medida que aumenta el tiempo de tratamiento.

Uno de los objetivos de la microbiología predictiva en alimentos es encontrar parámetros que den información sobre la resistencia de los microorganismos frente a una tecnología de conservación. Un estudio publicado por el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2006) sugiere que uno de los principales problemas para el desarrollo de la tecnología de los PEAI es la falta de modelos cinéticos donde se puedan obtener parámetros cinéticos primarios, que

describen la velocidad de inactivación, y parámetros secundarios, que describen la variación de los parámetros primarios al variar una variable del proceso. El presente estudio propone un parámetro z_a , usado previamente en otros estudios (Álvarez y col. 2003b; Rivas y col. 2006b), observando su evolución cuando se varía la temperatura de entrada.

a



b

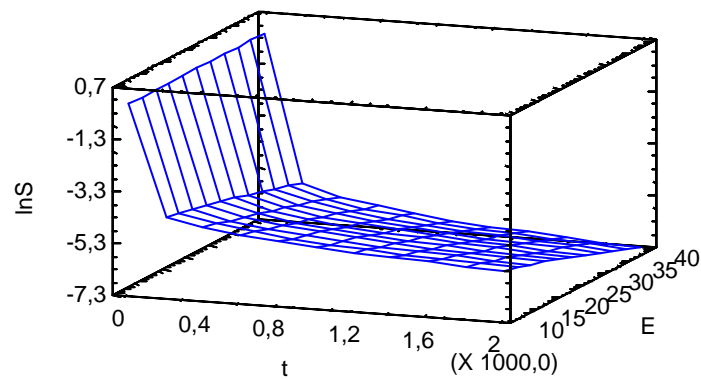


Figura IV.2.4. Superficie de respuesta predichas por los modelos globales (Ec.III.2.8 and Ec.III.2.9) para la inactivación por PEAI de *Saccharomyces cerevisiae* a 10 °C (a) y 32 °C (b).

Los parámetros β y δ (Tabla IV.2.6), obtenidos a partir de las ecuaciones de los modelos simplificados (Ec.IV.2.9 y Ec.IV.2.10) pueden ser usados para calcular parámetros secundarios semejantes al valor de z usado en el modelo de Bigelow para tratamientos térmicos. Se puede definir z_a como el incremento de la intensidad de campo eléctrico requerido para alcanzar una reducción logarítmica del valor del factor de escala. Este parámetro proporciona información de la sensibilidad de a a la tecnología de los PEAI.

$$z_a (10\text{ }^\circ\text{C}) = 30.76\text{ kV/cm}$$

$$z_a (32\text{ }^\circ\text{C}) = 25.31\text{ kV/cm}$$

Cuando el tratamiento por PEAI se combina con un incremento de la temperatura de entrada hasta 32°C se produce una disminución del valor de z_a , indicativo de que la sensibilidad de factor de forma es mayor cuando se combina PEAI y temperatura que con tratamientos de solo PEAI. El valor de z_a (43,1 kV/cm) obtenido para el caso de *E. coli* (Rivas y col. 2006b) suspendido en el mismo alimento y tratado por PEAI revela que el factor de escala para el *E. coli* es menos sensible al tratamiento por PEAI para este tipo de bebida que en el caso del factor de escala para el *S. cerevisiae*. Otros autores (Álvarez y col. 2003b), trabajando con tampón McIlvaine (pH 7,0), y con similares tratamientos (intensidad de campo eléctrico, tiempo y temperatura máxima de tratamiento), calcularon los valores de z_a para tres cepas de *Salmonella* y obtuvieron valores ligeramente inferiores que los obtenidos en este estudio. Alpas y col. (1998), trabajando con altas presiones en *L. innocua*, observaron la existencia de un efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos secundarios. Por tanto, el valor de z_a puede ser considerado como un parámetro de diseño para los PEAI debido a que puede ser usado para buscar un microorganismo de referencia para los tratamientos por PEAI.

El estudio energético solo muestra un efecto sinérgico cuando se combinan temperatura y pulsos en tratamientos que generan bajos niveles de energía, sin embargo, a partir de un valor energético, un aumento de la temperatura de entrada no produce un incremento de la inactivación. Los estudios energéticos son una herramienta útil para la industria alimentaria debido a que ayudan a seleccionar el mejor tratamiento ya que tiene engloba la intensidad de campo, el tiempo de tratamiento y la temperatura en un solo parámetro.

Los modelos matemáticos son una herramienta fundamental para optimizar la producción y la cadena de distribución de los alimentos. Las curvas de supervivencia obtenidas en este estudio no siguen cinéticas de primer orden siendo la función de distribución de Weibull la que mejor se ajusta a los datos experimentales. A la vista del comportamiento de los parámetros (a, n), el modelo puede ser simplificado a una función dependiente de la intensidad de campo y tiempo de tratamiento para cada temperatura de entrada, permitiendo obtener de este modo parámetros cinéticos secundarios (z_a). Estos parámetros describen el comportamiento del parámetro a , indicativo de la resistencia del *S. cerevisiae* a los PEAI, y con ellos es posible identificar un microorganismo de referencia para diseñar las condiciones óptimas de proceso. El estudio de los efectos de los factores externos en la inactivación es una herramienta básica en el APPCC, ya que proporciona información sobre los límites de seguridad del proceso y por tanto ayuda en la toma de decisiones. En este estudio, la variación en la temperatura de entrada del producto revela una dependencia de los parámetros de Weibull de la temperatura. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para confirmar la utilidad del modelo de Weibull para obtener parámetros cinéticos primarios y secundarios para otros microorganismos y en otros alimentos, además de comprobar el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos.

IV.2.4 REFERENCIAS.

Abram, F., Smelt J. P. P. M., Bos R. and Wouters, P. C. 2003. Modelling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment. *Journal Applied Microbiology*, 94, 571–579.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. and Ray, B. 1998. Interaction of pressure, time and temperature of pressurization on viability loss of *Listeria innocua*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 14, 251–253.

Álvarez, I., Mañas, P., Condón, S. and Raso, J. 2003a. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal Food Microbiology*, 87, 87–95.

Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S. and Raso, J. 2003b. Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *Journal Food Science*, 68(7), 2316–2320.

Ananta, E., Heinz, V., Schlüter, O. and Knorr, D. 2001. Kinetics studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovation Food Science Emerging Technology*, 2, 261–272.

Aronsson, K. and Rönner, U. 2001. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovation Food Science Emerging Technology*, 2, 105–112.

Barsotti, L., Dumay, E., Mu, T. H., Fernández, M. D. and Cheftel, J. C. 2002. Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends Food Science Technology*, 12, 136–144.

Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V. and Martín, O. 2002. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends Food Science Technology*, 13(6/7), 195–204.

De Paoli, P. 2005. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Review*, 29, 897–910.

Fernández, A., Collado, J., Cunha, L. M., Ocio, M. J. and Martínez, A. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal Food Microbiology*, 77, 147–153.

Kimball, D. A. 1999. Analysis of Citrus Microbiology. In Citrus Processing. A complete guide, pp.297–312. Gaithersburg, Maryland. Aspen Publishers.

Korolczuk, J., Ripoll McKeag, J., Carballeira Fernandez, J., Baron, F., Grosset, N. and Jeantet, R. 2006. Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation. *Journal Food Engineering*, 75, 11-20.

Liang, Z., Mittal, G. S., and Griffiths, M. W. 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric fields. *Journal Food Protection*. 65, 1081-1087.

Martín, O., Swanson, B. G., Chang, F. J., Qin, B. L. and Barbosa-Cánovas, G. V. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal Food Process Engineering*. 20, 317–336.

Min, S., Min, S. K. and Zhang, Q. H. 2003. Inactivation kinetics of tomato juice lipoxigenase by pulsed electric fields. *Food Engineering Physical Properties*, 68(6), 1995–2001.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 2006. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal Food Protection*, 69(5), 1190–1216.

Parish, M. E. 1988. Microbiological aspects of fresh squeezed citrus juice. In Ready to serve citrus juices and juice added beverages (Ed R. F. Matthews) pp.79–96. Gainesville. University of Florida.

Pataro, G.; Senatore, B.; Donsi, G.; Ferrari, G. 2011. Effect of electric and flow parameters on PEF treatment efficiency. *Journal of Food Engineering* 105(1): 79-88.

Peleg, M. 1999. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*, 32, 271–278.

Peleg, M. 2000a. Microbial survival curves – the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International*, 33, 531–538.

Peleg, M. 2000b. Modelling and simulating microbial survival in foods subjected to a combination of preservation methods. In *Innovations in Food Processing* (Eds G. V. Barbosa-Cánovas and G. W. Gould) pp.163–181. Lancaster. Technomic.

Peleg, M. and Cole, M. B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 38, 353–380.

Peleg, M. and Cole, M. B. 2000. Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments. *Journal Food Safety*, 16, 287–299.

Pérez, O. E. and Pilosof, A. M. R. 2004. Pulsed electric fields effects on the molecular structure and gelation of β -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Research International*, 37, 102–110.

Pina Pérez, M.C., Rodrigo Aliaga, D., Ferrer Bernat, C., Rodrigo Endíganos, M., and Martínez López, A. 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal*, 17, 1441-1449.

Pina-Perez, M. C.; Silva-Angulo, A. B.; Rodrigo, D.; Martinez-Lopez, A. 2009. Synergistic effect of pulsed electric fields and CocoanOX 12% on the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 130(3): 196-204.

Qin, B. L., Pothakamury, U. R., Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O. M, Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1995. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technology*, 12, 55–60.

Ratkowsky, D. A. 1990. *Handbook of Nonlinear Regression Models*. New York. Marcel Dekker Inc.

Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cánovas, G. V. and Rodrigo, M. 2006a. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Food Science Technology*, 39(10), 1163–1170.

Rivas, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A. and Rodrigo, M. 2006b. Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research Technology*, 223(4), 541–545.

Rodrigo, D., Martínez, A., Harte, F., Barbosa-Cánovas, G. V. and Rodrigo, M. 2001. Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange-carrot juice by means of Pulsed Electric Fields: comparison of inactivation kinetic models. *Journal Food Protection*, 64, 259–263.

Rodrigo, D., Ruíz, P., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A. and Rodrigo, M. 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal Food Microbiology*, 81, 223–229.

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A. and Rodrigo, M. 2006. Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage. *European Food Research Technology*, 223(1), 30–34.

Sampedro, F., Geveke, D. J., Fan, X., Rodrigo, D., & Zhang, Q. H. 2009. Shelf-life study of an orange juice-milk based beverage after PEF and thermal processing. *Journal of Food Science*, 74, 107–112.

Sampedro, F.; Rodrigo, D.; Martínez, A. 2011. Modelling the effect of pH and pectin concentration on the PEF inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by using the Monte Carlo simulation. *Food Control* 22(3--4): 420-425.

San Martín, M. F.; Sepulveda, D. R.; Altunakar, B.; Gongora-Nieto, M. M.; Swanson, B. G.; Barbosa-Canovas, G. V. 2007. Evaluation of selected

mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Food Science and Technology* 40(7): 1271-1279.

Sensoy, I., Zhang, Q. H. and Sastry, S. K. 1997. Inactivation kinetic of *Salmonella dublin* by pulsed electric fields. *Journal Food Process Engineering*, 20, 367-381.

Sepúlveda, D. R., Góngora-Nieto, M., San-Martín, M. F. and Barbosa-Cánovas, G. V. 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Food Science Technology*, 38, 167–172.

Stern, J. A. and Proctor, B. E. 1954. A micro-method and apparatus for the multiple determination of rates of destruction of bacteria and bacterial spores subjected to heat. *Food Technology*, 8, 139–143.

Van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal Food Microbiology*, 74, 139–179.

Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O., Chang, F., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields. *Journal Food Process Preservation*, 20(6), 501–510.

Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. 2009. Antimicrobial effect and shelf-life extension by combined thermal and pulsed electric field treatment of milk. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 241–248.

Yeom, H. W., Streaker, C. B., Zhang, Q. H. and Min, D. B. 2000. Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 4597–4605.

**CAPÍTULO 3: Modelización del efecto del
procesado por PEAI y por tratamiento térmico
sobre la estabilidad de la pectín-metilesterasa
en una bebida de zumo de naranja y leche**

IV.3.1 INTRODUCCIÓN.

La estabilización de los zumos cítricos normalmente se alcanzan mediante una o dos etapas de pasteurización, evitando así el deterioro microbiológico y de la calidad debido a la acción enzimática. La acción de la pectin-metilesterasa (EC3.1.1.11) es la principal causa de la pérdida de calidad en zumos de cítricos (Braddock, 1999; Elez-Martínez y col., 2007), al producir una clarificación del zumo como resultado de una esterificación de la pectina durante su procesado y almacenamiento (Kimball, 1991). En el caso de la pasteurización térmica, al ser los microorganismos más sensibles que la pectin-metilesterasa, ésta se toma como indicador para determinar el tratamiento térmico idóneo. Desafortunadamente, el tratamiento térmico induce cambios físicos y químicos no siempre deseables, especialmente en el caso de los zumos derivados de cítricos (Giner y col., 2001).

La efectividad de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en la inactivación microbiológica ha sido comprobada en diversos alimentos, como la leche, los zumos de frutas y vegetales y el huevo líquido. De igual modo, numerosos estudios han mostrado la habilidad de los PEAI en inactivar enzimas en alimentos o sustratos de referencia. En el caso de un alimento complejo, como es el caso de una bebida de zumo de naranja y leche, los PEAI se ha visto como una tecnología de conservación válida tanto desde un punto de vista microbiológico (Rivas y col., 2006 (a); Rivas y col., 2006 (b); Sampedro y col., 2006 (a); Sampedro y col., 2006 (b)) como nutricional (Rivas y col., 2006 (c)). Sin embargo, no existen estudios profundos del efecto de los PEAI en la actividad enzimática de la PME en bebidas de este tipo.

El National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2006) ha comentado que la escasez de modelos predictivos y de parámetros cinéticos impiden una adecuada comparación de los diferentes estudios de PEAI. Tradicionalmente, los intentos de obtener estos modelos se han focalizado en aspectos microbiológicos, que por otra parte son necesarios para obtener alimentos

seguros. Sin embargo, en zumos de cítricos o derivados, la pectin-metilesterasa es más resistente a las tecnologías de conservación que los microorganismos alteradores o patógenos más comunes, haciéndose imprescindible la obtención de modelos que describan la inactivación de la PME para así obtener alimentos seguros y que mantengan su calidad original. Como se ha indicado anteriormente, existen numerosos estudios de inactivación enzimática por PEAI, pero hay una escasez de estudios que la modelicen. (Elez-Martínez y col., 2006; Elez-Martínez y col., 2007; Min y col., 2003; Rodrigo y col., 2003;).

Se ha verificado que la combinación de temperatura y tecnologías no térmicas (Altas Presiones o PEF) es una estrategia adecuada para incrementar la inactivación enzimática (Ho y col., 1997; Van Loey y col. 2002; Yeom y col., 2000). El objetivo del presente estudio era encontrar un modelo matemático que pueda explicar la inactivación de la PME en una bebida de zumo de naranja y leche como resultado de combinar el efecto de la temperatura y los PEAI.

IV.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.3.2.1 Preparación de la bebida.

La bebida consta de zumo fresco de naranja (extraído a partir de frutas lavadas de la variedad Valencia Late mediante extractores rotatorios de zumo situados en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)), leche UHT desnatada (origen comercial), pectina de alto metoxilo (Unipectine, Degussa Texturant Systems France SAS, Boulogne, France), agua destilada y azúcar (origen comercial). Y su formulación es: zumo (50% (vol/vol)), agua (30% (vol/vol)), leche (20% (vol/vol)), azúcar (7.5% (wt/vol)) y pectina (0.3% (wt/vol)). El azúcar y la pectina se adicionaron al agua en primer lugar. La bebida era preparada inmediatamente antes de realizar los tratamientos.

Se determinó en la bebida la conductividad eléctrica (Crison 525 conductimeter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain) y el pH (Crison

2001 pH-meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain). Los resultados fueron los siguientes: una conductividad eléctrica de 2.91 mS cm^{-1} y un pH de 4.00.

IV.3.2.2 Ensayo de la Pectin metilesterasa.

La actividad de la PME se determinó mediante la medición de la liberación de ácido por unidad de tiempo a pH 7.0 y 22°C (Crelie et al., 1995). En primer lugar se prepara una mezcla de bebida (5 mL) y una solución de pectina cítrica al 0,35% (30 mL) conteniendo 0,12 mM de NaCl. Previo a la adición de la muestra, la solución de pectina se ajustó a un pH de 7,0. Durante la hidrólisis a 22°C , el pH se mantenía a 7 por la adición de NaOH a 0,05 N mediante un “pH-stat titrator” (Metrohm, Switzerland). Cada 2 s, para tiempos de reacción de 5 o 10 minutos, se registró el consumo de NaOH al 0,05 N. La actividad de la PME es proporcional a la velocidad de consumo de NaOH $(\Delta V_{\text{NaOH}}) / \Delta t$. Una unidad de la actividad de PME puede ser expresada como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de ácido por minuto a pH 7 y 22°C :

$$PME(U / mL) = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{V_s \cdot t_r} \quad (\text{Ec.IV.3.1})$$

donde V es el volumen de NaOH usado durante la valoración; N es la normalidad del NaOH (0.05 N); V_s es el volumen de la muestra y t_r es el tiempo de reacción.

IV.3.2.3 Sistema de tratamiento por PEAI.

El equipo de PEAI utilizado se ha descrito en el apartado IV.1.2.4.

El flujo de producto se ajustó a 60 ml/min mediante una bomba peristáltica (Millipore Corporation, Bedford, MA). Se aplicaron pulsos cuadrados bipolares de un ancho de 2.5 μs . Los experimentos se realizaron por triplicado.

IV.3.2.4 Diseño del estudio cinético.

La inactivación de la PME en la bebida combinando los tratamientos térmicos y los PEAI se estudió mediante un diseño factorial con 4 intensidades de campo eléctrico (10, 20, 30 y 40 kV/cm), 3 temperaturas de entrada (30, 35 y 40 °C), y 6 tiempos de tratamiento (entre 0 y 1900 μ s) diferentes para cada uno de las 12 combinaciones intensidad de campo / temperatura (**Tabla IV.3.1**). Los tiempos de tratamiento se eligieron dependiendo de las expectativas de inactivación.

Tabla IV.3.1. Condiciones de tratamiento usados en este estudio.

Variables	Rango
E (kV/cm)	10-40
t (μ s)	0-1900
Temperatura entrada (°C)	30-40
Temperatura salida (°C)	30-65

La actividad residual (RA) de PME obtenida tras cada tratamiento por PEAI se define como:

$$RA = A / A_0 \quad (\text{Ec.IV.3.2})$$

donde A es la actividad de PME tras el tratamiento y A_0 es la actividad inicial de PME antes de cada tratamiento.

En el estudio cinético, las curvas de inactivación obtenidas se ajustaron a varios modelos descritos en la literatura, usados para explicar curvas de supervivencia de microorganismos tratados por PEAI o por otras tecnologías de conservación. La selección de los modelos se basó en su capacidad para explicar curvas de supervivencia que presentan “hombros”. Mientras que el modelo de Weibull se ha usado previamente en otros estudios para describir la inactivación enzimática (Elez-Martínez y col., 2007; Rodrigo y col., 2003), los modelos Log-

logístico y de Baranyi no se han usado nunca para explicar la inactivación enzimática.

Modelo de Baranyi:

El modelo de Baranyi se desarrolló originalmente para curvas de crecimiento microbiológico (Baranyi y col., 1993; Baranyi y Roberts, 1994), sin embargo Xiong y col. (1999) adaptaron este modelo a curvas de supervivencia, obteniendo las siguientes ecuaciones:

$$\log_{10} RA = \log_{10} (q_B + (1 - q_B) e^{-k_{\max}(t-B(t))}) \quad (\text{Ec.IV.3.3})$$

donde

$$B(t) = \frac{r}{3} \left(\frac{1}{2} \ln \frac{(r+t)^2}{r^2 - rt + t^2} + \sqrt{3} \arctan \frac{2t-r}{r\sqrt{3}} + \sqrt{3} \arctan \frac{1}{\sqrt{3}} \right) \quad (\text{Ec.IV.3.4})$$

Este modelo se adapta bien a curvas de tipo sigmoideal. El parámetro q_B , puede ser usado como un indicador de la presencia de colas en las curvas de inactivación. El parámetro k_{\max} es el ratio máximo relativo de inactivación y puede ser considerado como la velocidad constante de inactivación para la fase lineal de la curva. Por último, $B(t)$ es la función de ajuste para colas, y se define por medio de r , que es el tiempo requerido para que la velocidad relativa de inactivación alcance la mitad de la velocidad máxima relativa de muerte (k_{\max}).

La ventaja de este modelo es su flexibilidad, ya que se adapta tanto a curvas no sigmoideales como a curvas que no presenten colas ($q_B = 0$) (Ec.IV.3.5):

$$\log_{10} RA = -\frac{t - B(t)}{D_{\min}} \quad (\text{Ec.IV.3.5})$$

donde $D_{\min} = 2.303/k_{\max}$, siendo D_{\min} el tiempo mínimo de reducción decimal, y se define como el mínimo tiempo requerido para obtener una reducción de un ciclo logarítmico de la actividad enzimática a una temperatura de referencia.

Modelo de Weibull:

El modelo de Weibull se define por la Ec.IV.3.6:

$$\text{LogRA} = -\left(\frac{t}{a}\right)^n \quad (\text{Ec.IV.3.6})$$

donde a y n son los factores de escala y forma respectivamente. El factor de escala es un tiempo en concreto que representa el tiempo necesario para alcanzar la primera reducción decimal ($RA = 0,10$). El factor de forma se interpreta como un índice del comportamiento (Cunha y col., 1998). Este modelo es interesante para explicar la cinética de degradación química, enzimática y microbiológica, que pueden considerarse como fallos del sistema tras ser sometido el producto a condiciones de estrés en un tiempo dado (Collado y col., 2003). La velocidad de fallo para el modelo de Weibull es una función creciente con el tiempo para $n > 1$, y una función decreciente para $n < 1$. El factor de escala (a) es igual que el tiempo de reducción decimal (D) cuando $n = 1$, ya que la ecuación representa el modelo tradicional log-lineal. Cuando $n \neq 1$, se necesitan ambos parámetros, a y n , para predecir el nivel de inactivación enzimática.

Modelo Logístico:

El modelo de Whiting (1993), derivado del modelo de Kamau y col. (1990), tiene en cuenta la presencia de "hombros" en la parte inicial de la curva de supervivencia. Por otro lado, se distinguen dos poblaciones bacterianas o fracciones enzimáticas, con una de ellas con una mayor resistencia. Esto lleva a una curva de inactivación con linealidad diferente, presentando la segunda una menor pendiente negativa (presencia de colas).

$$\log_{10}\left(\frac{A}{A_0}\right) = \log_{10}\left[\frac{F_1(1 + \exp(-b_1 t_i))}{1 + \exp(b_1(t - t_i))} + \frac{(1 - F_1)(1 + \exp(-b_2 t_i))}{1 + \exp(b_2(t - t_i))}\right] \quad (\text{Ec.IV.3.7})$$

con b_1 , siendo la velocidad máxima de inactivación específica de la población mayoritaria ($1/\mu s$); b_2 , la velocidad máxima de inactivación específica de la otra subpoblación ($1/\mu s$); F_1 , la fracción de enzima inicial correspondiente a la población mayoritaria; $(1-F_1)$, la fracción de enzima inicial correspondiente a la otra subpoblación; y t_i , el tiempo que dura el “hombro” de la curva (μs).

De igual modo que en el modelo de Baranyi, el modelo Logístico se adapta a diferentes tipos de curvas de inactivación. La Ec. IV.3.8 es la que mejor se adapta a las curvas que presentan un hombro inicial seguida de una caída lineal:

$$F_1 = 1; \quad t_i \neq 0.$$

$$\log_{10}\left(\frac{A}{A_0}\right) = \log_{10}\left[\frac{1 + \exp(-b_1 t_i)}{1 + \exp(b_1(t - t_i))}\right] \quad (\text{Ec.IV.3.8})$$

IV.3.2.5 Análisis estadístico.

Se llevaron a cabo tratamientos por triplicado. Los resultados obtenidos se expresaron como media de las medidas \pm desviación estándar. Tanto los análisis de la varianza de los resultados como las regresiones no lineales usadas para calcular los parámetros de los modelos se realizaron con el software Statgraphics Centurion XV 15.1.03 (Statistical Graphics Corp.).

La precisión del ajuste de los modelos se evaluó por medio de los análisis del Error Cuadrático Medio (MSE) y del “Accuracy Factor” (Af).

El MSE se define a partir de la siguiente ecuación

$$MSE = \frac{\sum(\text{predicho} - \text{observado})^2}{n-p} \quad (\text{Ec.IV.3.9})$$

donde n es el número de observaciones y p es el número de parámetros a estimar por el modelo. A menor valor de MSE, mejor es el ajuste dado por el modelo.

El Accuracy factor se define con la siguiente ecuación (Ross, 1996):

$$Af = 10^{\frac{\sum |\log_{10}(\text{predicho} / \text{observado})|}{n}} \quad (\text{Ec.IV.3.10})$$

donde n es el número de observaciones. A valores más cercanos a 1 mejor es el ajuste dado por el modelo.

IV.3.3 RESULTADOS.

IV.3.3.1 Estudio de inactivación.

La Figura IV.3.1 muestra las curvas de inactivación de la PME obtenidas como resultado de someter la bebida a los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad, variando la intensidad de campo eléctrico (E), el tiempo de tratamiento (t) y la temperatura de entrada del alimento (T). La máxima inactivación alcanzada fue del 95,8% al aplicar un tratamiento de 20 kV/cm, 800 μ s, y 40 °C de temperatura de entrada. Elez-Martínez y col. (2007) alcanzaron una inactivación de la PME del 80% en zumo de naranja (35 kV/cm; 1500 μ s; pulsos cuadrados bipolares de 4 μ s; temperatura máxima 37,5 °C), y Sampedro y col. (2009) obtuvieron una inactivación del 90% PME aplicando 25 kV/cm y una temperatura máxima de 65 °C en zumo de naranja y leche. Espachs-Barroso y col. (2006) estudiaron el efecto de los PEAI en PME purificada de varios orígenes (naranja, tomate, zanahoria t banana) observando que la inactivación de la PME era influida por el origen de la misma. Incluso, para un mismo alimento, el tipo de variedad del mismo influye en la inactivación, tal y como observó Sentandreu y col. (2006) al estudiar la inactivación de la PME por PEAI (25 kV/cm; 340 μ s; temperatura máxima 63 °C) en zumo de naranja de tres variedades (Clementina, Ortanique, and Valencia Late). Estos autores alcanzaron niveles de inactivación del 90,6% (Valencia Late), 88,3% (Clementina), and 85,2% (Ortanique). En otros productos que contienen zumo de naranja, como es el caso de zumo de naranja-zanahoria, se han obtenido inactivaciones de PME del 81,4% (25 kV/cm; 340 μ s; temperatura máxima 63 °C),

menores a los obtenidos en zumo de naranja con similares condiciones de tratamiento (Rodrigo y col. 2003) Por tanto, esta variedad en los resultados se debe principalmente a las diferentes condiciones de tratamiento y al tipo de alimento.

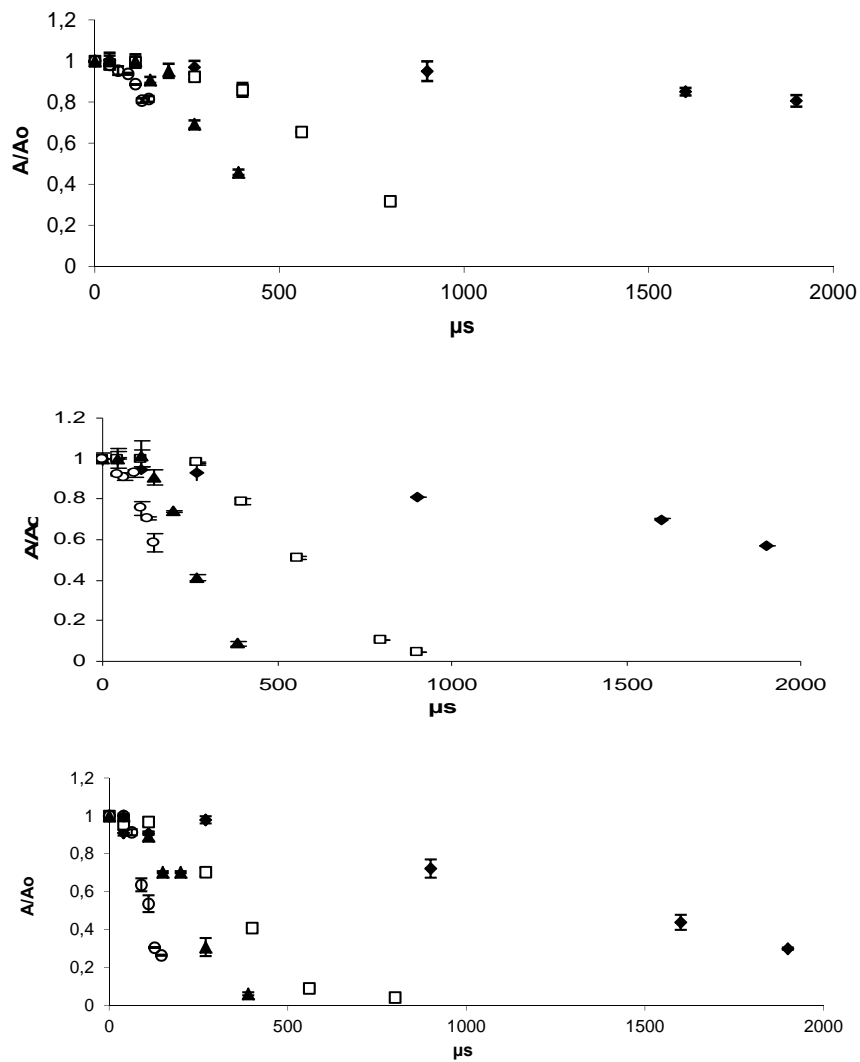


Figura IV.3.1. Curvas de inactivación de PME en una bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI (\blacklozenge 10kV/cm; \square 20 kV/cm; \blacktriangle 30 kV/cm; \circ 40 kV/cm) a diferentes temperaturas de entrada: (a) 30 °C; (b) 35 °C; (c) 40 °C.

Tal y como era de esperar, en el rango de temperaturas estudiada, al aumentar la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento se incrementa la inactivación de la PME ($p \leq 0,05$). Este efecto se ve potenciado al aumentar la temperatura de entrada (Figura IV.3.2). Similar comportamiento fue observado por Rodrigo y col. (2003) al tratar zumo de naranja-zanahoria por PEAI (25 kV/cm; 340 μ s) a dos niveles de temperatura (27 °C and 57 °C).

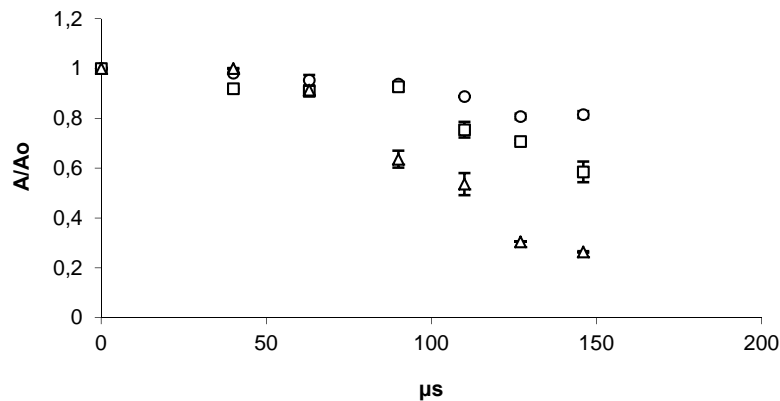


Figura IV.3.2. Comparación de las curvas de inactivación de PME a 40 kV/cm, variando la temperatura de entrada (30 °C (○); 35 °C (□); 40 °C (△)).

Se observa que las curvas de inactivación obtenidas no siguen una tendencia lineal con el tiempo de tratamiento. Éstas presentan hombros, observándose tiempos umbrales diferentes para cada intensidad de campo eléctrico y temperatura de entrada de producto. Para tiempos de tratamiento iguales o superiores a los tiempos umbrales, un incremento de la temperatura de entrada implica un aumento de la inactivación ($p \leq 0,05$) (Figura IV.3.1), indicativo de una disminución de la resistencia enzimática a los PEAI. Por otro lado, para la intensidad de campo de 40 kV/cm, al aumentar la temperatura de entrada disminuye la duración de los hombros (90 μ s para 30 y 35 °C; 60 μ s para 40 °C) (Figura IV.3.2). Hay varias hipótesis para explicar el alejamiento de la linealidad de las curvas de inactivación de enzimas tratadas por PEAI. En el caso de la presencia de colas en las curvas de

inactivación de POD en zumo de naranja, Elez-Martínez y col. (2006), de igual modo que Clemente (1998, 2002) en el caso de POD tratada térmicamente, sugieren la presencia de isoenzimas o de fracciones con diferentes resistencias. Varios estudios han sido publicados sobre la desintegración de las membranas celulares en tejidos vegetales por efecto de los PEAI (Asavasanti y col., 2011; Fincan y Dejmek, 2002; Jemai y Vorobiev, 2006; Lebovka y col., 2004). Gurdejan y col. (2007) observaron una mejora en la extracción de compuestos funcionales del aceite de semillas de colza al aplicar tratamientos de PEAI tan suaves como de 5 y 7 kV/cm. Como resultado del fenómeno anteriormente descrito, tratamientos suaves de PEAI puede incrementar la extracción de PME procedentes de la pulpa residual del zumo, contrarrestando la inactivación producida, explicándose así la presencia de hombros en las curvas de inactivación para tratamiento de baja intensidad.

Tabla IV.3.2. Valores de los parámetros de los modelos de Weibull, Baranyi, y Logístico ± desviación estándar obtenidos al ajustarse a los datos experimentales de inactivación de PME.

Temperatura entrada (°C)	Intensidad Campo eléctrico (kV/cm)	Weibull			Baranyi			Logístico	
		α (μ s)	n	r (μ s)	D_{min} (μ s)	δ_1 (μ s)	δ_2 (μ s)	t_1 (μ s)	t_2 (μ s)
30	10	323,92±627,51	1,2541±0,2778	-0,0474±0,0494	19844,67±393,50	0,0010±0,0004	0,0010±0,0004	3082,61±207,34	
	20	761,77±9,51	2,7403±0,1935	571,30±32,53	478,75±59,75	0,0038±0,0005	0,0038±0,0005	662,97±112	
	30	426,34±6,96	2,5654±0,0200	237,50±20,36	416,20±27,58	0,0105±0,0007	0,0105±0,0007	366,69±5,02	
	40	319,51±16,35	1,9184±0,0889	56,13±1,46	853,30±41,0	0,0151±0,0001	0,0151±0,0001	226,87±1,73	
35	10	3343,03±1112,03	1,2725±0,3372	119,53±199,81	3372,67±661,42	0,0007±0,0003	0,0007±0,0003	1137,84±180,32	
	20	622,84±3,30	3,0961±0,0814	740,05±45,32	1594,5±19,02	0,0090±0,0002	0,0090±0,0002	560,70±3,60	
	30	287,83±1,56	2,8814±0,1145	287,30±15,58	1041,8±12,25	0,0173±0,0005	0,0173±0,0005	251,27±2,94	
	40	188,26±18,03	2,6640±0,4997	114,04±36,68	183,12±104,22	0,0254±0,0021	0,0254±0,0021	158,41±6,28	
40	10	1731,73±39,71	1,8995±0,2465	650,80±166,84	2311,33±349,10	0,0016±0,0002	0,0016±0,0002	1267,93±129,68	
	20	371,34±11,90	1,5710±0,0138	166,07±50,89	396,60±11,16	0,0065±0,0001	0,0065±0,0001	260,53±16,16	
	30	259,31±7,79	2,5595±0,0132	224,17±20,91	125,33±12,52	0,0168±0,0006	0,0168±0,0006	223,83±7,56	
	40	126,09±0,40	2,4035±0,0483	81,91±1,66	97,02±1,38	0,0317±0,0002	0,0317±0,0002	108,10±0,47	

IV.3.3.2 Estudio de la evolución de la temperatura.

La temperatura máxima de tratamiento es un factor a tener en cuenta en los estudios de inactivación por PEAI tanto en enzimas como en microorganismos debido a su influencia en los valores de inactivación alcanzados (Vega-Mercado y col., 1996; Sensoy y col., 1997; Liang y col., 2002; Sepúlveda y col., 2005; Korolczuk y col., 2006). Esta temperatura depende de numerosos factores: intensidad de campo eléctrico, tiempo de tratamiento, características del pulso aplicado (duración y tipo de pulso), propiedades del producto (básicamente la conductividad eléctrica del mismo) y la temperatura inicial del producto. En este estudio, donde los factores concernientes al producto y a las características del pulso se mantienen constantes, la temperatura final depende de la intensidad de campo eléctrico (E), el tiempo de tratamiento (t) y la temperatura inicial del producto (T_0):

$$T_{\max}(E, t, T_0) = T_0 + \Delta T \quad (\text{Ec.IV.3.11})$$

donde ΔT es el incremento de la temperatura debido al tratamiento. Si mantenemos constante la intensidad de campo eléctrico, existe una relación entre el incremento de la temperatura y el tiempo de tratamiento, que puede ser descrito mediante la siguiente ecuación (Ec.IV.3.12):

$$\Delta T = \sigma_{T,E} \cdot t + \omega_{T,E} \quad (\text{Ec.IV.3.12})$$

Ajustando los datos experimentales de ΔT a la ecuación anterior, se obtienen los valores de las pendientes de las curvas obtenidas, las ordenadas en el origen y los coeficientes de determinación en función de la intensidad de campo eléctrico (Tabla IV.3.3). Se puede observar que el valor de las pendientes de las regresiones lineales es dependiente de la intensidad de campo pero, para una intensidad de campo determinada es independiente de la temperatura inicial del producto ($p \leq 0,05$). Por tanto, el incremento de la temperatura depende únicamente de la intensidad de campo eléctrico y del tiempo de tratamiento.

$$\Delta T = f(E, t). \quad (\text{Ec.IV.3.13})$$

A la vista de estos resultados y para aumentar la robustez de estos resultados, se recalculó los parámetros de la regresión lineal ($\overline{\sigma}_E, \overline{\omega}_E$) independientemente de la temperatura aplicada (Tabla IV.3.3). Además se observe una relación entre el valor de los parámetros y la intensidad de campo eléctrico de acuerdo con las ecuaciones IV.4.14 y IV.4.15:

$$\overline{\sigma} = 0,001E^{1,8685} \quad (\text{Ec.IV.3.14})$$

$$\overline{\omega} = -0,005E^2 + 0,0302E - 0,3436 \quad (\text{Ec.IV.3.15})$$

Por tanto, al introducir las ecuaciones IV.4.12, IV.4.14 y IV.4.15 en la ecuación IV.4.11, se obtiene la ecuación de un modelo matemático experimental que relaciona la temperatura máxima de tratamiento con la temperatura inicial del producto, la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento (Ec.IV.3.16):

$$T_{\max} = T_0 + 0,0001E^{1,8685} \cdot t - 0,0005E^2 + 0,0302E - 0,3436 \quad (\text{Ec.IV.3.16})$$

A la luz de estos resultados es posible calcular la temperatura máxima de tratamiento en función de la temperatura de entrada, la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento aplicado. Además se comprueba que para el producto estudiado, el incremento de la temperatura debido al tratamiento es independiente de la temperatura de entrada del mismo.

Por lo tanto, aunque es complejo llevar a cabo estudios cinéticos basados en la temperatura máxima de tratamiento debido a su dependencia de las condiciones de tratamiento, la relación aquí obtenida (ec.IV.3.16) que relaciona la temperatura máxima de tratamiento con la temperatura de entrada, la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento, hace posible llevar a cabo estudios cinéticos de inactivación en función de la temperatura de entrada del producto.

Tabla IV.3.3 Valores de los parámetros de la regresión lineal del incremento de temperatura al variar la intensidad de campo eléctrico y temperatura de los alimentos de entrada.

Intensidad Campo eléctrico (kV/cm)	Temperatura entrada (°C)	σ (°C/ μ s)	R^2	$\bar{\sigma}$ (°C/ μ s)	$\bar{\omega}$ (°C)
10	30	0,0081	0,9990		
	35	0,0080	0,9991	0,0080	-0,0933
	40	0,0081	0,9970		
20	30	0,0312	0,9932		
	35	0,0296	0,9933	0,0300	0,0827
	40	0,0289	0,9934		
30	30	0,0596	0,9870		
	35	0,0623	0,9924	0,0606	0,1225
	40	0,0605	0,9857		
40	30	0,1113	0,9918		
	35	0,1032	0,9708	0,1087	0,0438
	40	0,1135	0,9907		

IV.3.3.3 Estudio cinético.

IV.3.3.3.1 Cálculo de los parámetros cinéticos.

Modelo de Baranyi

Los valores de los parámetros del modelo de Baranyi (r y D_{min}) se muestran en la Tabla IV.3.2. Para intensidades comprendidas entre 20 y 40 kV/cm, el parámetro r se puede considerar como parámetro cinético ya que disminuye su valor al aumentar la intensidad de campo eléctrico ($p \leq 0,05$) independientemente de la temperatura de entrada. Sin embargo, en relación con el efecto de la temperatura de entrada, no se observa una tendencia de los valores del parámetro al variar la temperatura, por tanto, el parámetro r no puede considerarse como representativo de la resistencia de la PME en las condiciones de trabajo estudiadas. Mediante una

regresión múltiple se obtuvo una relación entre el logaritmo de r , la temperatura de entrada, y la intensidad de campo eléctrico, considerando $\log r$ como variable dependiente (Ec.IV.3.17) ($R^2 = 0,9162$). La influencia de la temperatura y la intensidad de campo eléctrico sobre el parámetro r se estudió mediante una ANOVA multifactor de r con T y E como factores (Tabla IV.3.4). Se observó que la intensidad de campo eléctrico tenía una mayor influencia sobre el parámetro que la temperatura de entrada del alimento (mayor valor del F-ratio).

$$20 \leq E \text{ (kV/cm)} \leq 40$$

$$\log r = 0,175436 + 0,136007*T - 0,00215227*T^2 - 0,00184664*E^2 + 0,00169468*E*T \quad (\text{Ec.IV.3.17})$$

Tabla IV.3.4. Influencia de las variables intensidad de campo eléctrico y temperatura de entrada sobre los parámetros de los modelos de Weibull, Baranyi, y Logístico.

Modelo	Parámetro	Variables	F-ratio
Weibull	$\log a$	E	447,00
		T	50,95
Baranyi	$\log D_{min}$	E	115,93
		T	38,27
	$\log r$	E	28,84
		T	6,15
Logístico	b_1	E	91,23
		T	11,03
	$\log t_1$	E	119,83
		T	22,92

Respecto del parámetro D_{min} , sus valores muestran que no se puede considerar como un indicador de la resistencia de la enzima debido a que se observa una tendencia definida al variar tanto la intensidad de campo como la temperatura de

entrada (tabla IV.3.2). Como en el parámetro r , la intensidad de campo tiene una mayor influencia en el valor de D_{min} que la temperatura de entrada (tabla IV.3.4).

Modelo de Weibull

Como se muestra en la tabla IV.3.2, los valores de a del modelo de Weibull dependen significativamente ($p \leq 0,05$) de la intensidad de campo y la temperatura de entrada, ya que disminuye su valor al aumentar tanto la intensidad como la temperatura. Por tanto, el parámetro puede considerarse como un indicador de la resistencia de PME al tratamiento por PEAI. Existen estudios contradictorios acerca del parámetro a como indicador de resistencia enzimática a los PEAI. Mientras Rodrigo y col. (2003) lo consideran como un indicador de resistencia en el caso de la PME en zumo de naranja-zanahoria, Elez-Martínez y col. (2007) no lo considera en zumo de naranja, ya que su valor no depende de la intensidad de campo eléctrico, posiblemente debido a la gran variabilidad que presentan los valores. Sin embargo, en el caso de la inactivación de POD en zumo de naranja para tratamientos comprendidos entre 5 y 35 kV/cm y tiempos menores a 1500 μ s, el parámetro de escala depende del valor de E , y su valor disminuye al aumentar la intensidad de campo eléctrico (Elez-Martínez y col. 2006).

Para el rango de intensidades estudiado, se realizó una regresión lineal múltiple para calcular la relación entre el logaritmo de a , la intensidad de campo y la temperatura de entrada, obteniéndose un nivel de confianza del 99% y una R^2 de 0,98 (**Ec.IV.3.18**).

$$\log a = 5,09567 - 0,0171546 * T - 0,0998034 * E + 0,00123509 * E^2 \quad (\text{Ec.IV.3.18})$$

En el caso del parámetro n de Weibull no se observa una tendencia en sus valores al variar la intensidad de campo o la temperatura de entrada (Tabla IV.3.2).

De igual modo que los parámetros r y D_{min} del modelo de Baranyi, los análisis de la varianza de los valores de a y n indican que la intensidad de campo eléctrico tiene una mayor influencia en ellos que la temperatura de entrada (Tabla IV.3.3).

Modelo Logístico

Tal y como se observa en la tabla IV.3.2, el parámetro b_1 es dependiente tanto de la intensidad de campo como de la temperatura, incrementándose su valor al aumentar ambas condiciones de tratamiento ($p \leq 0,05$), pudiéndose considerar dicho parámetro, por tanto, como una medida de resistencia de la PME a los PEAI como a los PEAI combinados con calor.

La dependencia del valor de b_1 respecto de la intensidad de campo y la temperatura se calculó por medio de una regresión lineal múltiple, obteniéndose una relación entre b_1 y dos variables independientes (Ec.IV.3.19). La relación entre las variables es significativa al 99%.

$$b_1 = 8,932*10^{-3} - 1,29176*10^{-3}*E - 9,25519*10^{-6}*T^2 + 8,94694*10^{-6}*E^2 + 4,56094*10^{-5}*T*E \quad (\text{Ec.IV.3.19})$$

El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica el 96,898% de la variabilidad de b_1 .

De igual modo que b_1 , la duración del hombro de las curvas de inactivación (t_1) depende tanto de la intensidad de campo eléctrico como de la temperatura de entrada del producto. Se observa un descenso de su valor al aumentar tanto la intensidad de campo como la temperatura ($p \leq 0,05$) (Tabla IV.3.2), por tanto, el parámetro t_1 también se puede considerar como un indicador de la resistencia de la PME a la tecnología.

De igual modo que los parámetros de los modelos anteriormente descritos, se realiza una regresión múltiple, obteniéndose la Ec.IV.3.20 con un R^2 del 92,8%,

que relaciona el logaritmo de (t_i) y las dos variables independientes al significativamente al 99%.

$$\text{Log}(t_i) = 4,73914 - 0,0275946*T - 0,0664038*E + 0,000691664*E^2 \quad (\text{Ec.IV.3.20})$$

Como se observa en los otros parámetros, t_i es influenciada en mayor medida por la intensidad de campo que por la temperatura de entrada (Tabla IV.3.3).

La obtención de ecuaciones que relacionan los parámetros cinéticos con las variables tecnológicas es un paso previo fundamental para la obtención parámetros cinéticos secundarios y de modelos predictivos.

III.4.4.3.2 Selección del modelo.

La tabla IV.3.5 muestra los valores del MSE y del Accuracy Factor de los modelos Logístico, Baranyi y Weibull obtenidos al ajustar las curvas de inactivación. Los modelos se eligieron por su habilidad para explicar curvas de inactivación que presenten hombros, de ahí que los valores de MSE y de Af sean cercanos a 0 y 1, respectivamente, y por tanto, todos los modelos presenten un buen ajuste. Consecuentemente, la selección del modelo que mejor describa las curvas de inactivación se basará en la presencia de parámetros cinéticos en los modelos y en su comportamiento con las condiciones estudiadas.

En el caso del modelo de Weibull, aunque presente un parámetro cinético (a) que depende tanto de la intensidad de campo como de la temperatura (Ec.IV.3.18), no es posible obtener un modelo simplificado porque el parámetro de forma (n) no presenta una tendencia definitiva cuando varía la temperatura o la intensidad de campo. En el modelo de Baranyi, el parámetro r es solo indicador de la resistencia para el intervalo de intensidades entre 20 y 40 kV/cm (Ec.IV.3.17), y por tanto, la simplificación que se pudiese obtener de este modelo no abarcaría todas las condiciones estudiadas. El Logístico es el modelo que mejor describe las curvas de inactivación debido a que sus parámetros (b_i y t_i) pueden considerarse como

indicador de la resistencia de la enzima a los PEAI, presentando una tendencia en su comportamiento tanto al variar la intensidad como la temperatura (Ec.IV.3.19 y Ec.IV.3.20). Debido a lo anterior, es posible obtener un modelo simplificado que incluya el efecto del tiempo de tratamiento, la intensidad de campo y la temperatura de entrada para todas las condiciones estudiadas.

Tabla III.3.5. Valores de MSE y “Accuracy factor” de los modelos estudiados.

Temperatura entrada (°C)	Intensidad Campo Eléctrico (kV/cm)	Weibull		Baranyi		Logistic	
		MSE	Af	MSE	Af	MSE	Af
30	10	0,0112	1,1549	0,0006	1,0413	0,0003	1,0293
	20	0,0022	1,0881	0,0016	1,0755	0,0025	1,0938
	30	0,0014	1,0631	0,0015	1,0667	0,0016	1,0599
	40	0,0014	1,0684	0,0015	1,0711	0,0014	1,0669
35	10	0,0008	1,0481	0,0465	1,3604	0,0028	1,0889
	20	0,0006	1,0360	0,0004	1,0359	0,0003	1,0316
	30	0,0015	1,0610	0,0012	1,0583	0,0015	1,0662
	40	0,0008	1,0473	0,0005	1,0391	0,0010	1,0524
40	10	0,0018	1,0720	0,0024	1,0886	0,0016	1,0630
	20	0,0210	1,2742	0,0197	1,2728	0,0187	1,2597
	30	0,0070	1,1273	0,0064	1,1336	0,0051	1,1221
	40	0,0025	1,0787	0,0020	1,0592	0,0031	1,0947

III.4.4.3 Simplificación del modelo Logístico.

El objetivo final de cualquier estudio cinético debe ser la obtención de un modelo que englobe el mayor número de condiciones de tratamiento (en nuestro caso, el tiempo de tratamiento, la intensidad de campo eléctrico y la temperatura de

entrada del producto), y de este modo ser una herramienta fundamental para la implantación de cualquier proceso de conservación a escala industrial.

Es posible obtener un modelo simplificado al sustituir las ecuaciones Ec.IV.3.19 y Ec.IV.3.20 en la Ec.IV.3.8, que define al modelo Logístico, obteniendo de este modo, una ecuación que relaciona el logaritmo de (RA) con la intensidad de campo, el tiempo de tratamiento y la temperatura de entrada (Ec.IV.3.21).

$$\log_{10}(RA) = \log_{10} \left[\frac{1 + \exp(-(\alpha + \beta E + \chi T^2 + \delta E^2 + \varepsilon TE)(10^{\phi + \varphi T + \gamma E + \eta E^2}))}{1 + \exp((\alpha + \beta E + \chi T^2 + \delta E^2 + \varepsilon TE)(t - 10^{\phi + \varphi T + \gamma E + \eta E^2}))} \right] \quad (\text{Ec.IV.3.21})$$

Tabla IV.3.6. Parámetros estimados obtenidos al ajustar los modelos globales (Ec.IV.3.8 y Ec.IV.3.9) a la totalidad de los datos experimentales.

Parámetro	Estimación
A	0,0069±0,0090
B	-0,0002±0,0007
X	-6,83E-6±9,55E-6
Δ	-3,77E-7±8,32E-6
E	2,10E-5±1,18E-5
Φ	4,7060±0,1361
Φ	-0,0208±0,0023
Γ	-0,0746±0,0041
H	0,0008±7,79E-5

Para mejorar la estimación de los parámetros, todos los datos experimentales fueron ajustados a la Ec.IV.3.21 por medio de una regresión logarítmica. La aplicación de este análisis incrementa la precisión debido a que evita los posibles errores por la estimación de parámetros intermedios y también porque se usan todos los datos para la estimación de los parámetros (Fernández y col., 2002). La

estimación de los parámetros y los intervalos de confianza obtenidos se muestran en la Tabla IV.3.6.

La bondad del ajuste del modelo se calculó por medio de los valores del MSE y del Af (0,0094 y 1,1268 respectivamente), valores indicativos de un buen ajuste. El modelo experimental basado en el modelo Logístico relaciona satisfactoriamente las condiciones de tratamiento con el logaritmo de la actividad residual de la PME, dando predicciones con un error aproximado del 12,7%.

IV.3.4 CONCLUSIONES.

El mayor problema de la aplicación de cualquier tecnología de conservación en zumo de naranja es la inactivación de la pectin-metilesterasa, cuya acción causa una pérdida de la calidad del zumo. En el caso de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad, la aplicación de esta tecnología es una estrategia válida para la inactivación de microorganismos, pero insuficiente para alcanzar niveles de inactivación enzimáticos adecuados. Diversos autores han mostrado que la aplicación de los PEAI combinados con temperaturas suaves, siempre inferiores a las usadas en la pasteurización térmica, es una estrategia válida para incrementar la inactivación de la PME. Este estudio corrobora el efecto beneficioso al combinar PEAI-temperatura, obteniéndose niveles de inactivación de PME superiores al 90% con diversos tratamientos, niveles adecuados para la conservación de este alimento en refrigeración.

Entre los modelos capaces de explicar la presencia de hombros en las curvas de inactivación, el modelo Logístico es el que mejor se ajusta a las curvas. Para una mayor comprensión del efecto de cualquier tecnología, es esencial conocer el efecto de las condiciones de tratamiento (E , T) en la inactivación, y en este estudio, el efecto de la intensidad de campo es el que más influye en los parámetros cinéticos de los diferentes modelos. La dependencia de los parámetros del modelo Logístico (b_1 y t_i) de los parámetros tecnológicos hace posible construir un modelo

que relacione la inactivación de la PME con la temperatura de entrada, la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento, dando una herramienta esencial para la industria y una flexibilidad de acción para la búsqueda de los tratamientos más adecuados.

III.4.8 REFERENCIAS.

Aguilo-Aguayo, I.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. 2010. Impact of high-intensity pulsed electric field variables affecting peroxidase and lipoxygenase activities of watermelon juice. *Food Science and Technology* 43(6): 897-902

Asavasanti, S.; Ristenpart, W.; Stroeve, P.; Barrett, D. M. 2011. Permeabilization of plant tissues by monopolar pulsed electric fields: effect of frequency. *Journal of Food Science* 76(1): E98-E111.

Baranyi, J., Roberts, T. A., & McClure, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43–59.

Baranyi, J., & Roberts, T. A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 277–294.

Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2003. Reduction of protease activity in milk by continuous flow high-intensity pulsed electric field treatments. *Journal of Dairy Science*, 86, 697-703.

Bendicho, S., Giner, J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2003. Procesado de leche mediante aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (revisión). *Alimentaria*, 2, 95–104.

Braddock, R. J.. 1999. Single strength orange juices and concentrate. In R. J. Braddock, *Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology*, (pp. 53–83). New York: Wiley.

Clemente, E. 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 26–29.

Clemente, E. 2002. Peroxidase from oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *European Food Research Technology*, 215, 164–168.

Collado, J., Fernández, A., Cunha, L. M., Ocio, M. J., & Martínez, A. 2003. Improved model based on the Weibull distribution to describe the combined effect of pH and temperature on the heat resistance of *Bacillus cereus* in carrot juice. *Journal of Food Protection*. 66(6), 978–984.

Crelier, S., Tâche, M. C., Raemy, A., Renken, A., & Raetz, E. 1995. High-pressure for the inactivation of enzymes in food products: thermal and HHP treatment of tomato pectin methyl esterase. In: *Poster presentation at 9th world congress on food science & technology*, Budapest, Hungary.

Cunha, L. M., Oliveira, F. A. R., & Oliveira, J. C. 1998. Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering*, 37, 175–191.

Elez-Martínez, P., Aguilá-Aguayo, I., & Martín-Belloso, O. 2006. Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of Science and Food Agriculture*, 86, 71–81.

Elez-Martínez, P., Suárez-Recio, M., & Martín-Belloso, O. 2007. Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. *Journal Food Engineering*, 78, 184–193.

Espachs-Barroso, A., Van Loey, A., Hendrickx, M., & Martín-Belloso, O. 2006. Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(1–2), 40–48.

Fernández, A., Collado, J., Cunha, L. M., Ocio, M. J., & Martínez, A. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 147–153.

Fincan, M., & Dejmek, P. 2002. In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue, *Journal of Food Engineering* **55**, 223–230.

Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2001. Effects of pulsed electric processing on apple and pear polyphenoloxidases. *Food Science and Technology*, *7*(4), 339–345.

Giner, J., Bailo, E., Gimeno, V., & Martín-Belloso, O. 2005. Models in a Bayesian framework for inactivation of pectinesterase in a commercial enzyme formulation by pulsed electric fields. *European Food Research and Technology*, *221*, 255–264.

Giner, J., Grouberman, P., Gimeno, V., & Martín, O. 2005. Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: comparison of inactivation kinetic models. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*, 1613–1621.

Giner-Seguí, J., Bailo-Ballarín, E., Gorinstein, S., & Martín-Belloso, O. 2006. New Kinetic Approach to the Evolution of Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) Activity in a Commercial Enzyme Preparation Under Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Science*, *71*(6), E262-E269.

Guderjan, M., Elez-Martínez, P., & Knorr, D. 2007. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*, 55–62.

Ho, S. Y., Mittal, G. S., & Cross, J. D. 1997. Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Engineering*, *31*, 69–84.

Jemai, A. B., & Vorobiev, E. 2006. Pulsed electric field assisted pressing of sugar beet slices: Towards a novel process of cold juice extraction. *Biosystems Engineering* **93**, 57–68.

Kamau, D. N., Doores, S., & Pruitt, K. M. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Applied Environment Microbiology*, 56(9), 2711–2716.

Kimball, D. A. 1991. *Citrus processing: quality control and technology* (pp. 117–243). New York: Van Nostrand Reinhold.

Korolczuk, J., Ripoll McKeag, J., Carballeira Fernandez, J., Baron, F., Grosset, N., & Jeantet, R. 2006. Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation. *Journal Food Engineering*, 75, 11–20.

Kui Zhong, Jihong Wu, Zhengfu Wang, Fang Chen, Xiaojun Liao, Xiaosong Hu & Zhenhua Zhang. 2007. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry*, 100, 115–123.

Liang, Z., Mittal, G. S., & Griffiths, M. W. 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric fields. *Journal Food Protection*. 65, 1081–1087.

Lebovka, N. I., Praporscic, I., & Vorobiev, E. 2004. Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 9–16.

Min, S., Min, S. K., & Zhang, Q. H. 2003. Inactivation Kinetics of Tomato Juice Lipoxigenase by Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Science*, 68(6), 1995–2001.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 2006. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1190–1216.

Riener, J.; Noci, F.; Cronin, D. A.; Morgan, D. J.; Lyng, J. G. 2009. Effect of high intensity pulsed electric fields on enzymes and vitamins in bovine raw milk. *International Journal of Dairy Technology* 62(1): 1-6.

Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cánovas, G. V., & Rodrigo, M. 2006a. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Food Science and Technology*, 39, 1163–1170.

Rivas, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2006b. Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 541–545.

Rivas, A., Rodrigo, D., Company, B., Sampedro F., & Rodrigo, M. 2007. Effect of Pulsed Electric Fields on water-soluble vitamins and ACE inhibitory peptides added to a mixed orange juice and milk beverage. *Food Chemistry*. In press.

Rodrigo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2003. Pectin methyl esterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 66(12), 2336–2342.

Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Applied Bacteriology*, 81, 501–508.

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2006a. Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 30–34.

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2006b. Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice–milk based beverage: Effect of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 80, 931–938.

Sampedro, F.; Geveke, D. J.; Fan, X.; Rodrigo, D.; Zhang, Q. H. 2009. Shelf-life study of an orange juice-milk based beverage after PEF and thermal processing. *Journal of Food Science* 74(2): S107-S112, 2009.

Sentandreu, E., Carbonell, L., Rodrigo, D., & Carbonell, J. V. 2006. Pulsed Electric Fields Versus Thermal Treatment: Equivalent Processes To Obtain Equally Acceptable Citrus Juices. *Journal of Food Protection*, 69(8), 2016–2018.

Sensoy, I., Zhang, Q. H., & Sastry, S. K. 1997. Inactivation kinetic of *Salmonella dublin* by pulsed electric fields. *Journal Food Process Engineering*, 20, 367–381.

Sepúlveda, D. R., Góngora-Nieto, M., San-Martín, M. F., & Barbosa-Cánovas, G. V. 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Food Science Technology*, 38, 167–172.

Soliva-Fortuny, R., Bendicho-Porta, S., & Martín-Belloso, O. 2007. Modeling High-Intensity Pulsed Electric Field Inactivation of a Lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 89, 4096–4104.

Van Loey, A., Verachtert, B., & Hendrickx, M. E. 2002. Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends Food Science Technology*, 12, 94–102.

Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O., Chang, F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields. *Journal Food Process Preservation*, 20(6), 501–510.

Timmermans, R. A. H.; Mastwijk, H. C.; Knol, J. J.; Quataert, M. C. J.; Vervoort, L.; Plancken, I. van der; Hendrickx, M. E.; Matser, A. M. 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12(3): 235-243

Whiting, R. C. 1993. Modelling bacterial survival in unfavourable environments. *Journal Industry Microbiology*, 12, 240–246.

Xiong, R., Xie, G., Edmenson, A. S., Linton, R. S., & Sheard, M. A. A. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for

modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology*, 16, 269–279.

Yang, R. J., Li, S. Q., & Zhang, Q. H. 2004. Effects of Pulsed Electric Fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *Journal Food Science*, 64(4), FCT241-FCT248.

Yeom, H. W., Streaker, C. B., Min, B., & Zhang, Q. H. 2000. Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice. *Journal of Food Science*, 65(8), 1359–1363.

**CAPÍTULO 4: Efecto de los Pulsos
Eléctricos de Alta Intensidad en vitaminas
hidrosolubles y en péptidos inhibidores de la
ECA adicionados a una bebida mezcla de zumo
de naranja y leche**

IV.4.1 INTRODUCCIÓN.

La creciente preocupación de los consumidores por su salud y los nuevos estilos de vida, que les están alejando de hábitos alimentarios saludables, ha llevado a la industria a participar en la necesidad de producir alimentos que contribuyan a la prevención de enfermedades.

Uno de los compuestos nutritivos a tener en cuenta es el grupo de vitaminas hidrosolubles. En concreto, las vitaminas del grupo B son vitaminas hidrosolubles que tienen diversas propiedades biológicas fundamentales, tales como de protección frente al cáncer, frente a enfermedades cardíacas y de prevención de defectos en neonatos (Lucock, 2004). La estabilidad de este grupo de vitaminas depende de cada vitamina en concreto y de las condiciones ambientales, como la presencia de oxígeno, la luz y la presencia de ácidos. Otra causa de pérdida de vitaminas del grupo B es el tratamiento térmico, siendo la tecnología convencional para conservar este tipo de alimentos. El calor induce pérdidas en el contenido vitamínico que hace necesario la fortificación de estos alimentos para compensar esas pérdidas. La estabilidad térmica de las vitaminas hidrosolubles depende de cada vitamina, siendo la riboflavina la más termoestable y el ácido ascórbico la más termosensible en condiciones aeróbicas. Cuando la leche es pasteurizada, solamente un 10% de la riboflavina se destruye (Ford y col., 1969; Haddad y Loewenstein, 1983; Lavigne, 1989). Haddad y Loewenstein (1983) informan de una destrucción del 12% tras tratamientos térmicos suaves (72 °C durante 16 s), y entre el 25 y el 50% tras una pasteurización en botella. En el caso del ácido ascórbico, la destrucción debido al calor en la leche varía entre un 40 y un 60% dependiendo de la intensidad del tratamiento (Haddad & Loewenstein, 1983; Ford y col., 1969; Lavigne, 1989; Mottar & Naudts, 1979; Van Eeklen y Heijne, 1965).

Los péptidos biológicamente activos son péptidos de origen alimentario que además de su var nutricional, ejercen un efecto fisiológico en el cuerpo. Estos péptidos bioactivos son inactivos cuando forman parte de la proteína original, pero,

una vez liberados, funcionan como compuestos reguladores con actividad similar a hormonas en función de su composición y secuencia de aminoácidos (Meisel, 1997; Tome, 1998). Se han encontrado numerosos péptidos que presentan diversas actividades como opioides, aglutinantes de minerales, inmunomoduladores, anti-hipertensivos, antitrombóticos y como péptidos antimicrobianos (Meisel, 1998; Clare y Swaisgood, 2000; Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2003). Las proteínas de la leche, concretamente del suero, son la principal fuente de péptidos bioactivos (Dziuba y col., 1999), y la fermentación de la leche la principal estrategia para producirlos (Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2003; Gobbetti y col., 2004; Silva y Malcata, 2005).

La hipertensión es uno de los problemas de salud crónicos más comunes que se presentan en el mundo desarrollado. Se estima que cerca del 20% de la población adulta mundial sufren hipertensión. La prevalencia de la hipertensión se incrementa con la edad, afectando aproximadamente al 65% de la población en países occidentales con edades comprendidas entre 65 y 74 años (Alper y col., 2001; Duprezy col., 2002). La Enzima Conversora de la Angiotensina I (ECA) juega un papel importante en el sistema renina-angiotensina que regula la presión arterial, así como el balance de sal y agua (Eriksson y col., 2002; Riordan, 2003). Consecuentemente, la inhibición de la ECA, por medio de fármacos que inhiben la ECA y de péptidos naturales inhibidores, da como resultado un efecto antihipertensivo tanto en animales como en humanos hipertensivos (Takano, 1998; Cushman y Ondetti, 1999).

Desde el punto de vista nutritivo, los estudios de los PEAI se han centrado en leche y en zumos de vegetales y frutas, estudiándose principalmente su efecto en el contenido de la vitamina C, de carotenoides, de flavonoides y de la actividad antioxidante (Bendicho y col., 2002; Cortés y col., 2006; Sánchez-Moreno Plaza y col., 2005 (a); Sanchez-Moreno y col., 2005 (b); Torregrosa y col., 2006 (a); Torregrosa y col., 2006 (b)). Sin embargo, no se ha publicado información sobre la

efectividad de esta tecnología en el contenido de vitaminas hidrosolubles o de los péptidos inhibidores de la ECA en un alimento complejo como una bebida de zumo y leche. Por tanto, el objetivo de este estudio es, por una parte, evaluar el impacto de las tecnologías térmicas y de los PEAI sobre la actividad de los péptidos inhibidores de la ECA y sobre el contenido de vitaminas hidrosolubles (riboflavina, biotina, ácido pantoténico, y ácido fólico) en una bebida de zumo de naranja y leche, y por otra parte, estudiar el efecto del almacenamiento de las muestras fortificadas y tratadas.

IV.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.4.2.1 Preparación de la bebida.

La preparación de la bebida se preparó según el protocolo descrito en el ANEJO 1.

Se determinó en la bebida la conductividad eléctrica (Crison 525 conductimeter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), el pH (Crison 2001 pH-meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), la viscosidad (Haake Viscotester VT5, Thermo Electron Corporation, Sussex, UK), y el contenido en sólidos solubles (Atago RX-1000 digital refractometer, Atago Company Ltd, Tokyo, Japan). Los resultados de los análisis físico-químicos fueron los siguientes: una conductividad eléctrica de 2.91 mS/cm, un pH de 4.05, una viscosidad de 20 mPa/s y un contenido de sólidos solubles de 14.3 °Brix.

IV.4.2.2 Enriquecimiento con vitaminas.

Durante su preparación, la bebida se enriqueció con vitaminas hidrosolubles de origen comercial: Biotina (BioChemika), Ácido Fólico (Fluka), Riboflavina (Sigma) y con ácido pantoténico (D-Pantothenic Acid Hemicalcium Salt (Sigma)). Las vitaminas se adicionaron al agua antes de la adición del resto de los componentes. El nivel de fortificación se ajustó de acuerdo a los RDAs (Tabla

IV.4.1), asumiendo que una ingesta de 250 mL de bebida por día cubre las RDAs del grupo de personas con mayor demanda.

IV.4.2.3 Enriquecimiento con péptidos inhibidores de la ECA.

El efecto de las tecnologías de conservación sobre los péptidos inhibidores de la ECA se estudió usando la bebida descrita anteriormente, pero sustituyendo la leche por suero de leche fermentada y pasteurizada (75 °C 1 min) (proporcionado por Leche Pascual). El suero se obtuvo por centrifugación (20000 g; 10 min) seguido de una filtración (0.45 µm) (Muguerza y col., 2006). La bebida resultante tenía una conductividad eléctrica de 4.32 mS/cm y un pH de 3.99.

Tabla IV.4.1. RDA y nivel de fortificación en la bebida.

VITAMINA	RDA	GRUPO	BEBIDA	
			Previa fortificación (ppm)	Tras fortificación (ppm)
Biotina	35 µg/d	Lactantes	3.3	208,5
Fólico	600 µg/d	Embarazadas	-----	1283,5
Riboflavina	1,6 mg/d	Lactantes	483	12345,5
Pantoténico	7 mg/d	Lactantes	1179	44509,5

IV.4.2.4 Tratamiento térmico.

La intensidad del tratamiento térmico (84 °C y 95 °C; de 15 a 120 s) aplicado a las muestras fue similar a los datos por las industrias de zumos refrigerados (Chen y col., 1993; Jay, 1992). El tratamiento se realizó en un baño termostataado de agua. La bebida se envasó en bolsas de lámina de polietileno de 150 mL. Tras el llenado, las bolsas se sellaron al vacío mediante un termosellador Multivac (Multivac Export, Hünenberg, Switzerland). Se prepararon tres bolsas con muestra para cada

combinación tiempo-temperatura. La temperatura del producto se monitorizó por medio de un termopar sumergido en el producto y sellado a la bolsa. Cuando se alcanzaba el tiempo de tratamiento las bolsas se enfriaban en un baño de hielo. Los ensayos de inactivación térmica se realizaron por duplicado.

IV.4.2.5 Equipo de tratamiento por PEAI.

El equipo de PEAI utilizado se ha descrito en el apartado IV.1.2.4.

La temperatura de tratamiento máxima alcanzada durante las experiencias fue inferior a 55°C.

El flujo de producto se ajustó a 60 ml/min mediante una bomba peristáltica (Millipore Corporation, Bedford, MA). Se aplicaron pulsos cuadrados bipolares de un ancho de 2.5 μ s. Las condiciones de los tratamientos por PEAI estudiados fueron: tiempo de tratamiento entre 0 y 700 μ s, temperatura de entrada de 32°C e intensidades de campo eléctrico de 15, 25 y 40 kV/cm. Las experiencias se realizaron por triplicado.

IV.4.2.6 Envasado y almacenamiento de las muestras.

La bebida tratada por PEAI se envasaba en botes de polietileno limpios y estériles dentro de una cámara de flujo laminar eliminando el espacio de cabeza. Los botes cerrados se almacenaban a 4°C en condiciones de oscuridad.

IV.4.2.7 Estabilidad microbiológica.

Para el recuento microbiológico durante el almacenamiento, las muestras se diluían seriadamente, se sembraban en “Plate Count Agar” (PCA) para mesófilos totales y en “Acidified Potato Dextrose Agar” (PDA) para hongos y levaduras. Las placas se incubaron a 30°C durante 48h y 5 días para mesófilos y hongos y levaduras, respectivamente.

IV.4.2.8 Determinación de las vitaminas hidrosolubles.

Las cuatro vitaminas hidrosolubles se analizaron al mismo tiempo mediante un método HPLC–MS/MS previamente ajustado y validado para la bebida en cuestión en el Centro Tecnológico AINIA (Valencia-España).

Para determinar la exactitud del método, la linealidad, la precisión, la repetitividad y la recuperación, se analizaron las curvas estándar de calibración de la matriz de concordancia, blancos de la matriz y la recuperación de la muestra. Las muestras de recuperación se inyectaron a tres niveles con el fin de validar el método.

Todas las vitaminas fueron suministradas por Sigma-Aldrich Corp. Se prepararon soluciones estándar individuales (20 mg/L) pesando 10 mg de cada vitamina y disolviendo. Los patrones de calibración eran de 10, 20, 50, 100, y 200 µg/L en matriz para cuantificar las muestras. Las muestras se diluyeron y se filtraron por medio de un filtro de jeringa (0,45 µm) previo a la inyección en el HPLC–MS/MS.

El sistema HPLC–MS/MS era un Waters Alliance 2695 HPLC acoplado con un Waters Micromass Quattro micro API con modo electrospray y un software MassLynx 4.0 (Micromass). En este estudio, el HPLC–MS/MS se fijó al modo “Multiple Reaction Monitoring” (MRM).

IV.4.2.9 Condiciones del HPLC.

Se utilizó una columna C18 de fase reversa (150 x 2,1 mm HyPURITY AQUASTAR) con un tamaño de partícula de 0,3 µm. La fase móvil usada era 0.1% de ácido fórmico (disolvente A) y metanol (disolvente B). El gradiente lineal era 0–5 min: 20% B; 5–15 min: 20–80% B; 15–15,1 min: 80–20% B; 15,1–25 min 20% B. La velocidad de flujo era 0,2 mL/min. El volumen de inyección era 20 µL.

Tabla IV.4.2. Valores de los parámetros de la espectrometría de masas usados en la cuantificación de las vitaminas.

Analito	MRM Transición (m/z)	Voltaje de Cono (V)	Energía Colisión (eV)
Ácido Pantoténico	218 > 88	25	13
	218 > 146		17
Ácido Fólico	442 > 295	20	20
	245 > 97		20
Biotina	245 > 227	25	15
	377 > 172		40
Riboflavina	377 > 243	40	23

IV.4.2.10 Condiciones del MS-MS.

Voltaje capilar: 3,5 kV (electrospray positivo), 3,0 kV (electrospray negativo); voltaje del cono: ver el programa del MRM; (Tabla IV.4.2): voltaje del extractor: 5 V; Voltaje de lente RF: 0 V; temperatura fuente: 120 °C; temperatura desolvatación: 300 °C; flujo de gas de cono: 60 L/h; flujo de gas de desolvatación: 600 L/h (nitrógeno); resolución LM 1: 13; resolución HM 1: 13; energía de ion: 1 V; voltaje de entrada: 1 V; voltaje de colisión: ver el programa del MRM; voltaje de salida: 2 V; presión de colisión de la célula: $3,3 \times 10^{-3}$ mbar (argón); resolución LM 2: 14; resolución HM 2: 14; energía de ión: 3 V; voltaje del multiplicador: 650 V.

IV.4.2.11 Determinación de los péptidos inhibidores de la ECA.

La actividad enzimática de la ECA se determina mediante un ensayo colorimétrico basado en Hayakari y col. (1978) y Pedroche y col. (2002). La actividad inhibidora (IACE = ACE/ACE₁₀₀) de la bebida se obtuvo del cociente del valor de la actividad enzimática con (ACE) y sin (ACE₁₀₀) inhibidor (bebida).

El ensayo de la actividad de la ECA se llevó a cabo en una solución de incubación que contiene tampón fosfato de potasio (200 mM) con NaCl (600 mM) (pH 8.3), cloruro de sodio, HHL (Hippuryl-His-Leu), agua y la enzima (30 µL). La

reacción se inicia por la adición del sustrato, y la posterior incubación de la solución a 37°C durante 30 min. La reacción se bloquea al adicionar 1500 µL de tampón fosfato (200 mM; pH 8,3), y 750 µL de solución TT (cloruro cianúrico) al 3% en dioxano. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 10000 g durante 10 min. La solución de TT se une al ácido hipúrico, generado por la acción enzimática, formando un complejo que se detectará en la lectura espectrofotométrica a 282 nm. El control se prepara según el procedimiento anterior pero adicionando la solución de TT al 3% antes que el HHL.

La determinación de la actividad inhibidora de la muestra se realiza de igual modo, pero sustituyendo el agua de la mezcla de incubación por 25 µL de la bebida.

IV.4.3 Resultados.

IV.4.3.1 Vitaminas Hidrosolubles.

IV.4.3.1.1 Efecto de los tratamientos en las vitaminas.

El objetivo de esta investigación era estudiar el efecto de la tecnología de los PEAI en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche fortificada con biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina. Consecuentemente, se seleccionaron un amplio rango de condiciones de tratamiento ($E = 15\text{--}40$ kV/cm; $t = 40 - 700$ µs) (Tabla IV.4.3). Para evitar un posible efecto de pasteurización térmica, se controló la temperatura máxima alcanzada debido al tratamiento, manteniéndose siempre por debajo de 55°C. Estas condiciones de tratamiento eran similares a las usadas en la inactivación de *E. coli* en esta misma bebida (Rivas y col. 2006 (b)). Varios autores han conseguido niveles de inactivación microbiológica significativos en este tipo de bebida, tales como *L. plantarum* (Sampedro y col., 2006) o *S. cerevisiae* tras tratamientos similares. Estos estudios muestran un efecto protector del producto, debido a su complejidad, si se compara con las inactivaciones microbiológicas alcanzadas por PEAI en zumos de frutas o leche. Se ha

demostrado ampliamente la capacidad de los PEAI en inactivar enzimas, alcanzándose inactivaciones de PME superiores al 90% en zumo de naranja y naranja-zanahoria (Elez-Martínez y col., 2007; Min y col., 2003; Rodrigo y col., 2003; Rivas y col., 2006 (a); Yeom y col., 2002).

Tabla IV.4.3. Condiciones de tratamiento aplicados en el estudio del comportamiento de las vitaminas hidrosolubles y de la actividad inhibidora de la ECA adicionadas a la bebida mezcla de zumo de naranja y leche.

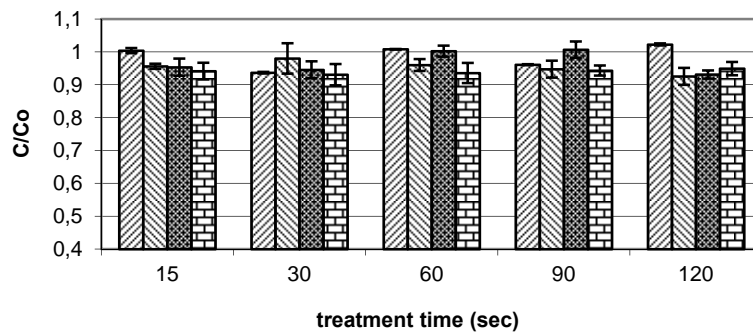
Tipo de estudio	Tecnología PEAI		Tecnología térmica	
	E (kV/cm)	Tiempo tratamiento (μ s)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo tratamiento (s)
Efecto tratamiento	15	40, 130, 300, 500, 700	84	15, 30, 60, 90, 120
	25	40, 130, 200, 230, 310	95	15, 30,
	40	40, 60, 80, 110, 130		45
Efecto almacenamiento	15	700	84	15, 60, 120
	40	130		

Como se puede observar en la Tabla IV.4.4, no hay cambios significativos ($p \leq 0,05$) en el contenido vitamínico tras los tratamientos aplicados. Estos resultados confirman la efectividad de los PEAI en preservar los compuestos nutritivos que otros estudios habían afirmado. Bendicho et al. (2002) también observaron la estabilidad a los PEAI (de 18,3 a 27,1 kV/cm; de 0 a 400 μ s) de las vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, colecalfiferol, y tocoferol) en dos sustratos diferentes (leche desnatada y leche desnatada simulada ultrafiltrada (SMUF)), excepto en el caso del ácido ascórbico, donde la retención sigue una cinética de primer orden. De igual modo, Torregrosa et al. (2006) confirmaron la degradación

por PEAI del ácido ascórbico en zumo de naranja-zanahoria (de 15 a 40 kV/cm; de 30 a 340 μ s), obteniéndose pérdidas del 10% del contenido inicial, siguiendo una cinética de inactivación de primer orden (con valores de k comprendidos entre 0,009 y 0,0220 μ^{-1}). Grahl and Märkl (1996) también redujeron el contenido del ácido ascórbico en leche tras el tratamiento por PEAI, aunque la vitamina A no se vió afectada. En bibliografía, no existen estudios en relación del efecto de esta tecnología en el contenido de biotina, ácido fólico o ácido pantoténico.

El efecto de la temperatura en la degradación de las vitaminas se estudió sometiendo a la bebida a dos temperaturas, 84 and 95 °C, con tiempos de tratamiento comprendidos entre 15 y 120 s (Tabla IV.4.3). La Figura IV.4.1 muestra el efecto del tratamiento térmico en el contenido vitamínico a 84 y a 95°C. Mientras que a 84 °C no existe un efecto estadísticamente significativo en cualquiera de los contenidos vitamínicos, a 95 °C, sin embargo, aparece una reducción del contenido de todas las vitaminas ($p \leq 0,05$), produciéndose pérdidas entre el 18 y el 23% para 45 s. En general, la respuesta de las vitaminas frente al tratamiento térmico difiere según el tipo, siendo las vitaminas hidrosolubles más termosensibles que las liposolubles (Bendicho et al., 2002; Rechciogl, 1982).

84°C



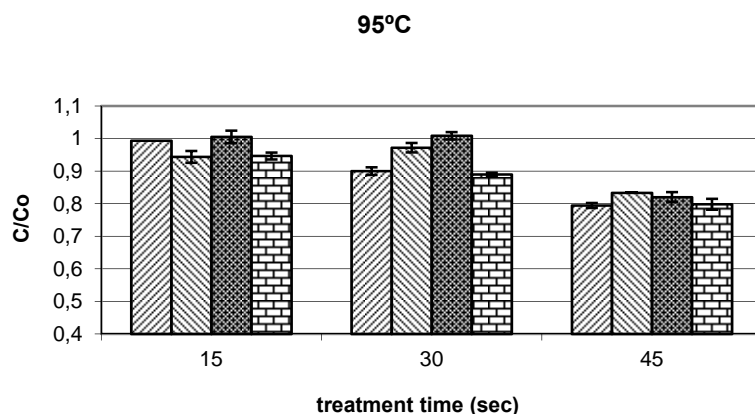


Figura IV.4.1. Efecto del tratamiento térmico (a. 84 °C; b. 95 °C) en el contenido vitamínico (Ácido pa \square ténico; Biotina; \square Ácido fó \square b; Riboflavina \square). Desviación estándar expresada como barras de error.

Varios estudios han estudiado la termoestabilidad de la riboflavina. Kwok y col. (1998) afirman que la riboflavina es más termoestable y menos sensible a la temperatura que la tiamina, siendo su termoestabilidad independiente del método de calentamiento (Ang y col., 1975). La esterilización de la leche produce un solo un 10% de destrucción (Ford y col., 1969; Haddad y Loewenstein, 1983; Lavigne, 1989). Diversos tratamientos térmicos (63, 80, 90, y 100 °C durante 30 min, 73 °C durante 15 min, y 90 °C durante 10 min) causaron reducciones despreciables (0–7%) en el contenido de riboflavina en leche de vaca y de camello (Mehaia, 1994). La baja termoestabilidad de la riboflavina a 95°C en este estudio comparado con otros estudios, tales como Mehaia (1994) o Sharma y Lal (1998), puede ser debido a la presencia de O₂ disuelto durante el proceso de pasteurización, de acuerdo con Dennison y col. (1977) que observaron que la estabilidad de la riboflavina se veía afectada por el oxígeno.

Tabla IV.4.4. Efecto del tratamiento por PEAI en el contenido de vitaminas hidrosolubles expresado como retención (C/C_0) \pm desviación estándar y actividad inhibitoria de la ECA (ACE/ACE_{100}) \pm desviación estándar.

E (kV/cm)	t(μ s)	Contenido Residual (C/C_0)				Actividad Residual Inhibitoria ($IACE_T/IACE_B$)
		Riboflavina	Ácido Fólico	Biotina	Ácido Pantoténico	
15	40	0.976 \pm 0.031	1.001 \pm 0.036	0.963 \pm 0.033	0.977 \pm 0.021	0.973 \pm 0.051
	130	1.003 \pm 0.024	0.985 \pm 0.044	0.977 \pm 0.016	0.946 \pm 0.039	0.992 \pm 0.032
	300	0.962 \pm 0.065	0.957 \pm 0.032	0.954 \pm 0.019	0.979 \pm 0.032	1.005 \pm 0.072
	500	1.002 \pm 0.045	0.934 \pm 0.011	0.995 \pm 0.034	0.953 \pm 0.027	1.025 \pm 0.043
	700	0.966 \pm 0.034	0.971 \pm 0.009	0.982 \pm 0.040	0.971 \pm 0.013	0.983 \pm 0.034
25	40	0.993 \pm 0.013	0.951 \pm 0.041	1.003 \pm 0.008	0.966 \pm 0.016	0.985 \pm 0.012
	130	1.005 \pm 0.022	0.955 \pm 0.038	1.001 \pm 0.015	0.947 \pm 0.028	0.969 \pm 0.031
	200	1.006 \pm 0.023	0.955 \pm 0.047	1.002 \pm 0.018	0.982 \pm 0.044	0.998 \pm 0.043
	230	0.982 \pm 0.045	0.958 \pm 0.032	1.001 \pm 0.043	0.964 \pm 0.063	1.005 \pm 0.023
	310	0.964 \pm 0.033	0.965 \pm 0.027	1.002 \pm 0.047	0.990 \pm 0.013	1.004 \pm 0.089
40	40	0.993 \pm 0.003	0.975 \pm 0.055	0.995 \pm 0.023	0.947 \pm 0.030	1.012 \pm 0.087
	60	0.974 \pm 0.045	0.951 \pm 0.067	0.972 \pm 0.011	0.981 \pm 0.043	0.973 \pm 0.047
	80	0.98 \pm 0.066	0.924 \pm 0.020	1.001 \pm 0.013	0.971 \pm 0.017	0.994 \pm 0.039
	110	0.966 \pm 0.030	0.974 \pm 0.052	0.977 \pm 0.026	0.991 \pm 0.013	0.977 \pm 0.075
	130	0.942 \pm 0.021	0.942 \pm 0.021	0.986 \pm 0.036	0.981 \pm 0.010	0.990 \pm 0.101

Los folatos son sensibles a los factores físicos como la temperatura, la presión y la exposición a la luz, y por tanto pueden ser afectados durante el procesado del alimento. Otro factor a tener en cuenta en la estabilidad de los folatos es la acidez del alimento. Wilson y Chen (1979) encontraron que el ácido fólico y el ácido 5-formiltetrahidrofólico eran estables cuando se calentaba durante 10 h a un pH comprendido entre 4 y 12, disminuyendo su estabilidad al disminuir el pH por debajo de 4. Estos autores también observaron que los derivados del metilfolato mostraban una alta estabilidad térmica a pH 7, y un rápido descenso de su estabilidad bajo condiciones alcalinas o ácidas. Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, donde el contenido en fólico es afectado

por la temperatura y el tiempo de tratamiento en un medio ácido como es nuestra bebida. Por otra parte, la estabilidad de los folatos también es afectada por la naturaleza de los mismos. Nguyen y col. (2003) afirman que durante la pasteurización (71.7 °C/15 s) de un sistema tampón, se perdieron entre un 10 y un 15% de ácido 5-metiltetrahidrofólico, degradándose totalmente con la esterilización (135 °C, 1 s), mientras que el ácido fólico no se vio afectado por la esterilización.

En general, la retención de la biotina es relativamente alta durante el tratamiento térmico (80% en carne, 85–90% en leche pasteurizada, 85–95% en legumbres, 70% en conservación de frutas y vegetales). Mientras que el cocinado de tomate produce disminuciones significativas en el contenido de biotina, las pérdidas fueron menores en patatas (Macova y Krkoskova, 2003).

El ácido pantoténico es la vitamina más estable al tratamiento térmico en un rango de pH entre 5 y 7. En la leche, el ácido pantoténico es estable durante la pasteurización, ya que el pH de la leche está comprendido en el rango de pH donde la vitamina es estable (Fox, 1997). Bergström (1994) observó que el ácido pantoténico podría ser afectado por la acidez del escabeche (pH 5.5).

Aunque los resultados obtenidos muestran que la tecnología de los PEAI no afecta a la estabilidad de las vitaminas, se observa, sin embargo, una pérdida de vitaminas tras los tratamientos térmicos más intensos, alcanzándose un máximo del 20% (95 °C, 45 s).

IV.4.3.1.2 Efecto del almacenamiento en la estabilidad de las vitaminas tratadas por PEAI o calor.

Un punto a tener en cuenta cuando se estudia el efecto de una tecnología de conservación de un factor en concreto, sea un microorganismo, una enzima, un factor de calidad o un compuesto nutritivo, es la estabilidad de dicho factor tras el tratamiento. En el caso de la tecnología de los PEAI, existen varios estudios que

comparan de alimentos tratados por PEAI o por calor desde un punto de vista microbiológico, de factores de calidad o de los compuestos nutritivos (Elez-Martínez y col., 2006; Min y Zhang, 2002; Min y col., 2003; Rivas y col., 2006 (a); Torregrosa y col., 2006). Sin embargo, no existen estudios de estabilidad realizados en bebidas fortificadas con vitaminas hidrosolubles tratadas con PEAI, o con cualquier otro factor en este tipo de bebida.

Para el estudio del almacenamiento, la selección de los tratamientos por PEAI se basó en la máxima inactivación de *E. coli* suspendida en el producto (Rivas et al., 2006 (b)); mientras en el caso del tratamiento térmico, se seleccionaron los tratamientos previamente estudiados que no causasen un cambio en el contenido de las vitaminas. La temperatura de almacenamiento de 4°C se seleccionó porque es la temperatura óptima para la conservación de alimentos tratados por HTST. El recuento total de mesófilos y el recuento de hongos y levaduras fueron monitorizados durante el almacenamiento, dando recuentos inferiores a 100 cfu/mL a los 81 días.

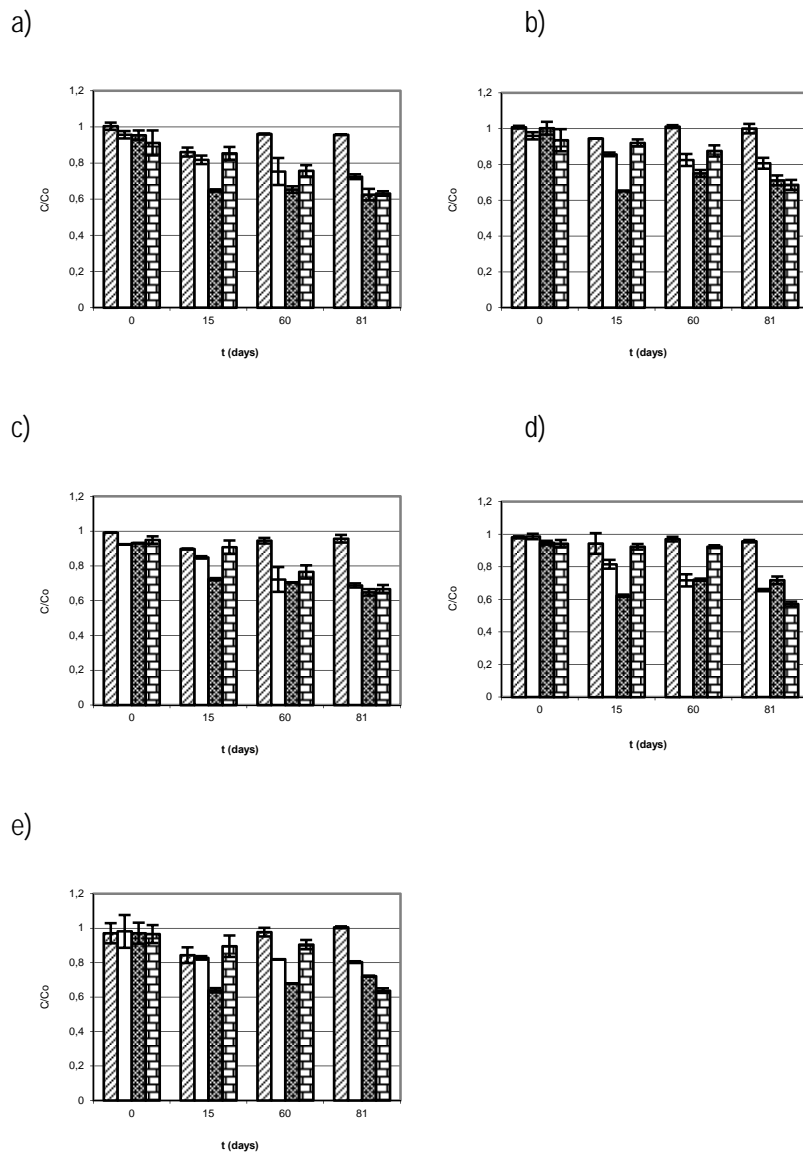


Figura IV.4.2. Efecto del almacenamiento en el contenido vitamínico (Ácido pantoténico; Biotin; Ácido Fólico; Riboflavina) de una bebida mezcla de leche y zumo de naranja tratada térmicamente (a. 84 °C 15 s; b. 84 °C 60 s; c. 84 °C 120 s.) o por PEAI (d. 40 kV/cm 130 μs; e. 15 kV/cm 700 μs.). Desviación estándar expresada como barras de error.

Como la Figura IV.4.2 muestra que la estabilidad de cada vitamina durante el almacenamiento tiene un comportamiento similar independientemente del tratamiento o de la tecnología aplicada ($p \leq 0.05$). El ácido pantoténico es la vitamina más estable, no siendo afectada por el tiempo de almacenamiento ($p \leq 0.05$). Aunque Bergström (1994) informan de la posible influencia de un pH bajo ($\text{pH} = 5.5$) del escabeche en la estabilidad del ácido pantoténico, los datos obtenidos muestran que para un pH 4 no aparecen pérdidas de la vitamina en la bebida y en el rango de tratamientos estudiados.

De igual modo que en el pantoténico, el comportamiento de la biotina durante el almacenamiento es independiente de la tecnología y de la intensidad del tratamiento ($p \leq 0.05$). Todas las muestras presentan la misma tendencia, con el contenido de biotina disminuyendo durante el almacenamiento, alcanzándose una degradación de entre el 20 y el 35% a los 81 días de almacenamiento. La pérdida del contenido de biotina podría ser debido a la presencia de O_2 disuelto en la bebida.

En el caso de la riboflavina, se observa un comportamiento diferente de las muestras según la tecnología aplicada (Figura IV.4.2). Mientras que la pérdida del contenido en riboflavina es gradual en muestras tratadas térmicamente durante el almacenamiento, alcanzándose una retención entre el 63 y el 68% tras 81 días, en las muestras tratadas por PEAI presentan un mayor nivel de retención a los 15 y 60 días de almacenamiento (90% de retención comparado con el 75% para muestras tratadas térmicamente). La pérdida del contenido en riboflavina durante el almacenamiento puede ser explicado por la presencia de O_2 , siendo la combinación de calor y O_2 más perjudicial para su estabilidad. Es conocido que la estabilidad de la riboflavina es afectada por el oxígeno, los sulfatos metálicos y la actividad de agua (Choe y col., 2005). Dennison y col. (1977) observaron que la presencia de O_2 durante el almacenamiento incrementa la velocidad de destrucción dramáticamente. Además, Gaylord y col. (1986) observaron una menor velocidad

de destrucción en leche entera que en leche desnatado. Consecuentemente, la combinación de O₂ y leche desnatada usada en esta bebida podría explicar la pérdida del contenido en riboflavina durante el almacenamiento.

Como se puede observar en la Figura IV.4.2, el ácido fólico es la vitamina hidrosoluble más sensible al almacenamiento a 4°C, independientemente de la tecnología aplicada. La destrucción de la vitamina está comprendida entre el 28 y el 36% tras 15 días, manteniéndose constante durante el resto del tiempo de almacenamiento. Aunque Eberhard y col., (2003) no observaron pérdidas en la concentración de ácido fólico durante el almacenamiento (4 semanas a 5 °C) en leche pasteurizada (HTST) (proceso directo 125 °C o proceso indirecto 115 °C), su estabilidad puede ser afectada por la presencia de O₂ (0.1 ppm O₂ = 0% pérdidas tras 60 días; 1–2ppm = 5%; 8 ppm = 100%) (Rossi y col., 1995) En nuestra bebida, la presencia de O₂ disuelto puede ser la causa de la pérdida de ácido fólico durante el almacenamiento.

IV.4.3.2 Actividad Inhibidora de la ECA.

IV.4.3.2.1 Efecto de los PEAI o el calor en la actividad inhibidora de la ECA.

Para la introducción de una nueva tecnología de conservación es esencial considerar los efectos de la tecnología desde varios puntos de vista, como la seguridad alimentaria y aspectos nutritivos y de calidad. La leche de vaca es una fuente única de compuestos nutritivos y bioactivos. Los compuestos proteicos de la leche contiene una variedad de aminoácidos y péptidos bioactivos con diferentes propiedades funcionales, siendo los péptidos inhibidores de la ECA los compuestos que la comunidad científica está haciendo un mayor esfuerzo para estudiar (Fitzgerald y Murray, 2006). Numerosos estudios se han centrado en la producción y aislamiento de los péptidos inhibidores de la ECA (Pihlanto-Leppälä, 2001; Yamamoto, 1997; Yamamoto y col., 2003), pero no existen estudios de estabilidad

de estos péptidos incorporados a un alimento complejo (una mezcla de zumo de naranja y leche) y procesados por PEAI o calor.

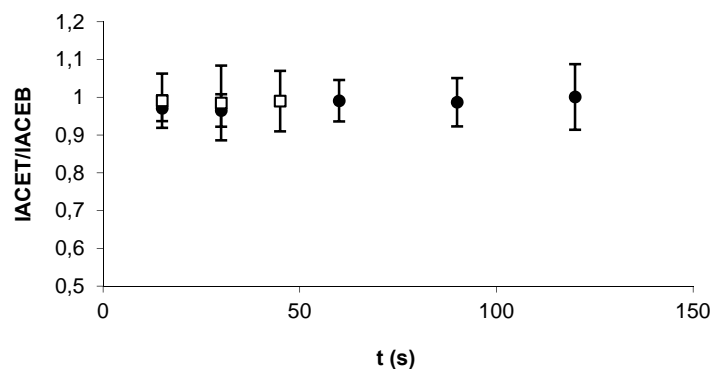


Figura IV.4.3. Efecto del tratamiento térmico en la acción inhibitoria en la ECA (● 84 °C; □95 °C). Desviación estándar expresada como barras de error.

La Tabla IV.4.4 muestra los valores de la capacidad inhibitoria de la ECA residual de la bebida ($IACE_T/IACE_B$) tras haber sido tratada por los PEAI, siendo $IACE_T$ y $IACE_B$ los valores de inhibición de la bebida tratada y sin tratar, respectivamente. Como se observa en la tabla, la variación de la intensidad de campo (de 15 a 40 kV/cm) o del tiempo de tratamiento (0–700 μ s) apenas afecta a la actividad inhibitoria de la ECA de la bebida ($p \leq 0,05$). En el caso del tratamiento térmico, la Figura IV.4.3 muestra la estabilidad del péptido independientemente de la intensidad de tratamiento (84 °C–95 °C) ($p \leq 0,05$).

En el estudio de la estabilidad de un factor en relación con una tecnología de conservación, tienen la misma importancia tanto el efecto inmediato de la tecnología como la evolución del factor durante el almacenamiento. La Figura IV.4.4 muestra la evolución de la actividad inhibitoria de la ECA de la bebida tratadas por las dos tecnologías y almacenadas a 4°C. Como se puede observar, no se aprecia variación en la actividad de cualquiera de las muestras durante el almacenamiento, tanto si son tratadas por PEAI o por calor. Estos resultados

muestran la validez de los PEAI para mantener la actividad inhibitoria de la ECA de la bebida. La elección entre aplicar los PEAI o un tratamiento térmico a una bebida fortificada con péptidos inhibidores de la ECA, no dependerá, por tanto, de la estabilidad de estos péptidos, sino que habrá que tener en cuenta otros factores (microbiológicos, nutricionales o de calidad).

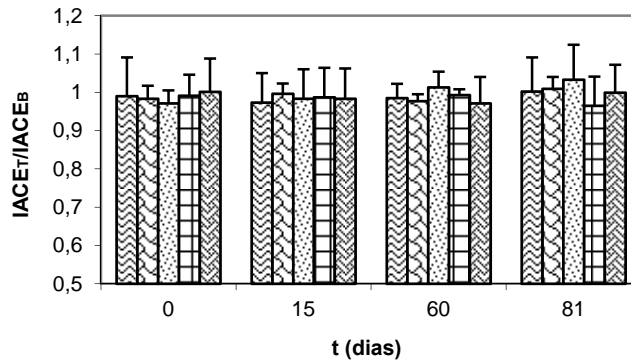


Figura IV.4.4. Efecto del almacenamiento en la actividad inhibitoria en la ECA (40 kV/cm, 130 μs; 15 kV/cm, 130 μs; 84 °C 15 s; 84 °C 60 s, 84 °C 120 s) de una bebida mezcla de zumo de naranja y leche tratada por PEAI o térmicamente. Desviación estándar expresada como barras de error.

IV.4.4 CONCLUSIONES.

El paso más importante cuando se estudia la implantación de una tecnología de conservación para un alimento de gran calidad, como es una bebida mezcla de zumo de naranja y leche fortificado con vitaminas hidrosolubles o péptidos inhibidores de la ECA, es conseguir alimentos seguros, con una mínima pérdida de calidad y de compuestos nutritivos durante el tratamiento y el posterior almacenamiento. Este estudio prueba la validez de los PEAI como tecnología de tratamiento para un alimento tan complejo como es esta bebida, ya que la

tecnología es capaz de conseguir niveles aceptables de destrucción enzimática y microbiológica en el mismo alimento o similares, sin verse afectado el contenido vitamínico o la capacidad inhibidora de la ECA. Si se compara la estabilidad de las vitaminas de la bebida al tratarse por PEAI o calor, se observa que los PEAI afecta de igual modo al contenido vitamínico (biotina, ácido fólico y ácido pantoténico) que los tratamientos térmicos suaves (84 °C) y en menor grado que los tratamiento térmicos más intensos (95 °C y 45 s). En el caso de la riboflavina, en las muestras tratadas por PEAI se observa una mayor estabilidad de la misma durante el almacenamiento (4°C durante 60 días) que las muestras tratadas térmicamente.

Sin embargo, no existen diferencias en la habilidad inhibidora de la ECA de la bebida cuando es tratada por los PEAI o por calor. Este estudio *in vitro* podría ser complementado por estudios *in vivo* de la biodisponibilidad de los péptidos antihipertensivos de la bebida al ser tratada por los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad o por calor.

IV.4.5 REFERENCIAS.

Alper, A. B., Calhoun, D. A., & Oparil, S. 2001. Hypertension. In *Encyclopedia of Life Sciences*, <http://www.els.net> (pp. 1-8). Nature Publishing Group.

Ang, C. Y. W., Chang, C. M., Frey, A. E., & Livingston, G. E. 1975. Effects of heating methods on vitamin retention in six fresh or frozen prepared food products. *Journal Food Science*, 40, 997-1003.

Barbosa- Canovas, G. V., & Sepúlveda, D. 2005. Present Status and the Future of PEF Technology. In *Novel Food Processing Technologies*. Boca Raton: CRC Press.

Bendicho, S., Espachs, A., Arántegui, J., & Martín, O. 2002. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research*, 69, 113-123.

Bergström, L. 1994. Nutrient losses and gains in the preparation of food. NLG report, National Food Administration, Sweden, Report No 32/1994.

Chen, C. S., Shaw, P. E., & Parish, M. E. 1993. Orange and tangerine juices. In S. Nagy, C. S. Chen & P. E. Shaw, *Fruit juice processing technology* (pp. 110-165). Auburndale, Fla: Agscience.

Choe, E., Huang, R., & Min, D. B. 2005. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *Journal Food Science*, 70 (1), R28-R36.

Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. 200). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal Dairy Science*, 83, 1187-1195.

Cortés, C., Torregrosa, F., Esteve, M. J., & Frígola, A. 2006. Carotenoid profile modification during refrigerated storage in untreated and pasteurized orange juice treated with High-Intensity Pulsed Electric Fields. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 54, 6247-6254.

Cushman, D. W., & Ondetti, M. A. 1999. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine*, 5, 1110-1112.

Davis, T., & Reinhardt, W. 2005. The dietary guidelines: Where food science and nutrition converge. *Food Technology*, 59(3), 20.

Dennison, D., Kirk, J., Bach, J., & Kokooczka. 1977. Storage stability of thiamin and riboflavin in a dehydrated food system. *Journal Food Procedure Preservation*, 1, 43-54.

Duprez, D., Van Helshoecht, P., Van den Eynde, W., & Leeman, M. 2002. Prevalence of hypertension in the adult population of Belgium: report of a worksite study, Attention Hypertension. *Journal Human Hypertension*, 16, 47-52.

Dziuba, J., Minkiewicz, P., & Nalecz, D. 1999. Biologically active peptides from plant and animal proteins. *Polish Journal Food Nutrition Science*, 8, 3-16.

Eberhard, P., Buetikofer, U., & Sieber, R. 2003. Vitamins in stored heated milk. *AgrarForschung*, 10(2), 62-65.

Elez-Martinez, P., Soliva-Fortuny, R. C., & Martin-Belloso, O. 2006. Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment. *European Food Research and Technology*, 222 (3-4), 321-329.

Elez-Martinez, P., Suarez-Recio, M., & Martin-Belloso, O. 2007. Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal Food Engineering*, 78 (1), 184-193.

Eriksson, U., Dzanilczyk, U., & Penninger, J. M. 2002. Just the beginning: novel functions for angiotensin-I-converting enzyme. *Current Biology*, 12, R745-R752.

Fitzgerald, R. J., & Murray, B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118-125.

Ford, J. E., Porter, J. W. G., Thompson, S. W., Toothill, L., & Edward-Webb, J. 1969. Effects of ultra-high temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content of milk. *Journal of Dairy Research*, 36, 447-454.

Fox, J. B. Jr., Lakritz, L., & Thayer, D. W. 1997. Thiamin, riboflavin and alpha-tocopherol retention in processed and stored irradiated pork. *Journal of Food Science*, 62 (5), 1022-1025.

Gaylord, A. M., Warthesen, J. J., & Smith, D. E. 1986. Influence of milk fat, milk solids, and light intensity on the light stability of vitamin A and riboflavin in lowfat milk. *Journal of Dairy Science*, 69 (11), 2779-2784.

Gobetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. 2000. Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898-3904.

Grahl, T., & Maerkl, H. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 (1/2), 148-157.

Haddad, G. S., & Loewenstein, M. 1983. Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin, and ascorbic acid content of milk. *Journal of Dairy Science*, 66(8), 1601-1606.

Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. 1978. A rapid and simple spectrophotometric assay of Angiotensin-Converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84, 361-369.

Jay, J. M. 1992. *Modern Food Microbiology*, 4th ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

Korhonen, H., & Philanto-Leppälä, A. 2003. Food-derived bioactive peptides – opportunities for design of future foods. *Current Pharmaceutical Designs*, 9, 1297-1308.

Kwok, K. C., Shiu, Y. W., Yeung, C. H., & Niranjana, K. 1998. Effect of thermal processing on available lysine, thiamine and riboflavin content in soymilk. *Journal Science Food Agriculture*, 77, 473-478.

Lavigne, C., Zee, J. A., Simard, R. E., & Belliveau, B. 1989. Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins B1, B2, and C and on the shelf-life of goat's milk. *Journal of Food Science*, 54 (1), 30-34.

Lucock, M. 2004. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ*, 328, 211-214.

Macova, E., & Krkoskova, B. 2003. Effect of heat processing on folic acid and biotin content in food of plant origin. *Agriculture - Pol'nohospodarstvo*, 49(7), 349-356.

Mehaia, M. A. 1994. Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat treatments. *Food Chemistry*, 50(2), 153-155.

Meisel, H. 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 43, 119 – 128.

Meisel, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8, 363-373.

Min, S., & Zhang, Q. H. 2003. Effects of commercial-scale pulsed electric field processing on flavor and color of tomato juice. *Food Chemistry Toxicology*, 68(5), 1600-1606.

Min, S., Jin, Z. T., Yeom, H. W., Min, S. K., & Zhang, Q. H. 2003. Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice. *Food Chemistry Toxicology*, 68(4), 1265-1271.

Mottar, J., & Naudts, M. 1979. Quality of UHT milk compared with pasteurized and in-bottle sterilized milks. *Lait*, 59(588), 476-488.

Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., & Recio, I. 2006. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61-69.

Nguyen, M. T., Indrawati & Hendrickx, M. 2003. Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51, 3352-3357.

Pedroche, J., Yuste, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. 2002. Utilization of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal Science Food Agriculture*, 82, 960-965.

Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology*, 11, 347-356.

Pszczola, D. E. 2005. Making Fortification Functional. *Food Technology*, 59(4), 44-61.

Rechciogl, M. 1982. *Handbook of nutritive value of processed food*, vol. 1, *Food for human use*. Boca Raton: CRC Series in Nutrition and Food.

Riordan, J. F. 2003. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology*, 4, 225.

Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cánovas, G. V., & Rodrigo, M. 2006 (a). Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Food Science and Technology*, 39, 1163-1170.

Rivas, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2006 (b). Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 541-545.

Rodrigo, D., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2003. Pectin Methyl Esterase and Natural Microbial Flora of Fresh Mixed Orange and Carrot Juice Treated with Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Protection*, 66, 2336-2342.

Rossi, J., Gobbetti, M., Buzzini, P., & Corsetti, A. 1995. L'effetto dei processi tecnologici sulla qualità del latte. *Il latte*, 11, 1036-1041.

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2006. Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 30-34.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. 2005. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53(11), 4403-09.

Sánchez-Moreno, C., Pilar-Cano, M., Ancos, B. de., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., & Martín, A. 2005. Intake of Mediterranean vegetable soup treated by pulsed electric fields affects plasma

vitamin C and antioxidant biomarkers in humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(2), 115-124.

Sharma, R., & Lal, D. 1998. Influence of various heat processing treatments on some B-vitamins in buffalo and cow's milks. *Journal Food Science Technology India*, 35(6), 524-526.

Silva, S. V., & Malcata, F. X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1-15.

Sloan, A. E. 2005. Top 10 global food trends. *Food Technology*, 59(4), 20-32.

Sobrinho, A., & Martín-Belloso, O. 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining High-Intensity Pulsed Electric Fields and nisin. *Journal Food Protection*, 69(2), 345-353.

Takano, T. 1998. Milk derived peptides and hypertension reduction. *International Dairy Journal*, 8, 375-381.

Tome, D. 1998. Functional peptides. In *Danone World Newsletter*.

Torregrosa, F., Esteve, M. J., Frígola, A., & Cortés, C. 2006 (a). Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange-carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. *Journal of Food Engineering*, 73, 339-245.

Torregrosa, F., Cortés, C., Esteve, M. J., & Frígola, A. 2006 (b). Effect of high-intensity pulsed electric fields processing and conventional heat treatment on orange-carrot juice carotenoids. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 9519-9525.

Van Eeklen, M., & Heijne J. J. L. C. 1965. Nutritive value of sterilised milk. Rome, Italy: Food Agriculture Organization of the United Nations, pp. 33-41.

Wilson, B. P., & Chen, T. S. 1979. Thermal degradation of folacin: Effect of pH and buffer ions. *Journal Food Science*, 44, 717-722.

Yamamoto, N. 1997. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, 43, 129-134.

Yamamoto, N., Ejiri, M., & Mizumo, S. 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Designs*, 9, 1345-1355.

Yeom, H. W., Chism, G. W., & Zhang, Q. H. 2002. Inactivation of pectin methyl esterase in orange juice by pulsed electric fields. *Food Engineering and Physical Properties*, 67(6), 2154-2159.

**CAPITULO 5: Potencial adaptación de
microorganismos tratados por Pulsos Eléctricos
de Alta Intensidad**

IV.5.1 INTRODUCCIÓN

Aunque el mecanismo de inactivación microbiológica por PEAI no ha sido completamente dilucidado, generalmente se considera que el principal factor es la permeabilización de la membrana debido a la formación de poros (Barbosa y col., 1999; Hamilton and Sale, 1967; Sale and Hamilton, 1967; Wouters y col., 1997; Wouters y col., 2001). Los poros formados pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo del grado de daño que ha sufrido la membrana. Las investigaciones en este campo se han centrado en la recuperación de posibles células dañadas y en el crecimiento de las células supervivientes tras el tratamiento por PEAI (Aronsson y col., 2004; García y col., 2005; Lado y col., 2004; Unal y col., 2002; Yaqub y col., 2004). Por otra parte, debido al mecanismo de inactivación microbiológica de los PEAI, por formación de poros en la membrana plasmática, se induce una expulsión de contenido celular al medio circundante (Aronsson y col., 2005; Barbosa y col., 1999). Si a lo anterior, se añade que las células dañadas (permeabilizadas) pueden recuperarse o repararse del daño tras el tratamiento, existe, por tanto, una posibilidad de formación de electro-transformantes con la presencia de ADN libre proveniente de las células muertas. La potencial transformación de microorganismos debe ser estudiado para evaluar el impacto de esta tecnología emergente de conservación sobre la seguridad alimentaria. Sin embargo, pocos estudios se han ocupado de evaluar la posibilidad de electro-transformación como consecuencia del tratamiento por PEAI, siendo esta característica ampliamente usada en biología molecular para la transformación bacteriana (Knorr y col., 1994; Solioz y Bienz, 1990).

Cuando una célula recibe un estímulo ambiental, su dotación genética activa una maquinaria que puede desencadenar un sinfín de respuestas. Existen múltiples evidencias de que la exposición de procariotas a condiciones sub-óptimas o estresantes modifica el perfil de proteínas e incluso induce la síntesis de proteínas específicas de respuesta al estrés (Ananta y Knorr, 2004; Periago y col., 2002;

Rieder y Lehner, 2007). En el caso de microorganismos patógenos, un cambio en la expresión de las proteínas puede desencadenar un cambio en la virulencia del microorganismo o un aumento de la resistencia frente a estreses, comprometiendo así la seguridad alimentaria del alimento tratado por PEF. La respuesta del *Escherichia coli* frente a la tecnología de los PEF ha sido ampliamente estudiada en alimentos como en medios de referencia, centrándose principalmente en estudios de inactivación, daño subletal y crecimiento tras el tratamiento. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado el tipo de modificaciones a nivel molecular que se producen al aplicar los PEF a células de *Escherichia coli* o de cualquier otro microorganismo.

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de bases para esclarecer el mecanismo de daño celular y posterior reparación de las células de dos tipos de microorganismos (*E. coli* DH5 α y *L. casei*) tratadas por PEF. Para ello se realizaron los siguientes estudios: (i) estudio de la resistencia del microorganismo a los PEF; (ii) estudio de la posibilidad de electrotransformación; (iii) evaluación del daño subletal debido al tratamiento; y (iv) evaluación de las modificaciones del perfil de proteínas del *E. coli* DH5 α . Este estudio ha sido concebido como una base para la determinación de criterios para un uso seguro de la tecnología de los PEF y para garantizar que esta tecnología no compromete la seguridad alimentaria.

IV.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.5.2.1 Preparación del cultivo de los microorganismos.

Escherichia coli

Se usó en este estudio, células de *E. coli* DH5 α . El cultivo de *E. coli* se preparó esencialmente como describió Dower y col. (1988). Brevemente, un cultivo fresco (pre-incubado durante 18 horas) de *E. coli* se usó para inocular caldo LB (10g triptona, 4,8 g extracto levaduras y 10g NaCl) seguido de una incubación hasta una DO final de 0,7 a 600 nm, enfriado en hielo, lavado dos veces con agua

fría y otra con glicerol (10% w/v), y suspendido en 1/250 del volumen del cultivo original en glicerol (10% w/v). La suspensión celular se envasó en alícuotas de 2 ml que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Lactobacillus casei

La cepa de *Lact. casei* usada en este estudio fue la CECT 5275. Para los propósitos experimentales, se prepararon dos tipos de cultivo: estándar y electro-competente. El cultivo estándar se preparó de la siguiente forma: un cultivo fresco (“overnight” o pre-incubado durante 12h) se usó para inocular caldo MRS, incubándose a continuación hasta una densidad óptica (DO) de 0,7 a 600 nm. Las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con caldo MRS y resuspendidos en 1/250 del volumen del cultivo original. Entonces, se adicionó glicerol al 80% hasta una concentración final del 20%. La suspensión celular se envasó en alícuotas de 2 ml y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

El cultivo electro-competente se preparó de forma diferente. Brevemente, un cultivo fresco (preincubado durante 12 horas) se usó para inocular caldo MRS suplementado con 10 g/l de glicina. Este caldo se incubó a 37°C hasta una DO de 0.7 a 600 nm. El cultivo resultante se enfrió en hielo, las células se recolectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con una solución tampón (fosfato sódico 5 mM, pH 7.4, MgCl₂ 1 mM), usando el mismo volumen que en el cultivo original. Las células fueron resuspendidas en tampón suplementado con 0.3 M de sacarosa (PMS) en 1 / 200 del volumen del cultivo original. La suspensión celular se envasó en alícuotas de 2 ml que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

IV.5.2.2 Sistema de tratamiento por PEAI

El equipo de PEAI utilizado se ha descrito en el apartado IV.1.2.4.

IV.5.2.2.1 Inoculación de muestras y de muestras control

Escherichia coli

Previamente al tratamiento por PEAI, las alícuotas se descongelaron en hielo y se adicionaron a 200 ml de glicerol frío (10%) obteniéndose una concentración final aproximada de 5×10^8 cfu/ml.

Lactobacillus casei

Previo a los ensayos con PEAI, las alícuotas congeladas de suspensiones celulares (estándar y electro-competentes) se descongelaron en hielo. Mientras que a la suspensión estándar se adicionó a 250 ml de agua peptonada (3 g / l), a la suspensión electro-competente se adicionó el mismo volumen, pero de RMS. El plásmido pIA β 8 también se adicionó, en ambas suspensiones, hasta una concentración final de 100 ng / μ l. Las muestras control se preparaban de igual modo que las dos suspensiones pero sin la adición del plásmido.

Tabla IV.5.1 Condiciones de Tratamiento por PEAI para el estudio en *L. casei*.

Tratamiento	Tipo de cultivo	Medio de tratamiento	E (kV/cm)	Anchura Pulso (μ s)	t (μ s)
T1	Estándar	Agua Peptonada (3 g/l)	20	2.5	300
T2	Estándar	Agua Peptonada (3 g/l)	20	20	2400
T3	Estándar	Agua Peptonada (3 g/l)	20	20	800
T4	Electro-competente	Tampón fosfato ⁽¹⁾	20	20	800

⁽¹⁾ Tampón fosfato: (Na₃PO₄ 5 mM, pH 7.4, MgCl₂ 1 mM)+ 0.3 M sacarosa

IV.5.2.2.2 Tratamientos por PEAI del estudio de adaptación de *L. casei*

La Tabla IV. 5.1 muestra los tratamientos de PEAI realizados para el estudio de daño subletal y posibilidad de transformación de *L. casei*. Mientras la temperatura de entrada era de 11°C, la temperatura máxima de tratamiento era inferior a 20°C.

IV.5.2.2.3 Tratamientos por PEAI del estudio de adaptación de *E.coli*.

Estudio cinético

Las condiciones de tratamiento fueron las siguientes: velocidad de flujo: 60 ml/min; pulsos cuadrados bipolares de 20 μ s; tiempos de tratamiento: 0-9000 μ s; intensidad de campo eléctrico: 15-30 kV/cm. La temperatura de tratamiento se mantuvo por debajo de 25°C. Las experiencias se realizaron por triplicado.

Tabla IV.5.2. Condiciones de tratamiento por PEAI para el estudio de *E. coli*.

Tipo de estudio		E (kV/cm)	t (μ s)	T ^a entrada
Estudio cinético		15-30	0-9000	7°C
Estudio de daño subletal	Efecto E-t	15-30	0-9000	7°C
	Efecto T ^a	15	700 y 1000	7, 16, 24, 30 y 38°C
Estudio de transformantes	Efecto E-t	15-30	700 y 1000	7°C
	Efecto T ^a	15	700	7, 16, 24, 30 y 38°C
Estudio de proteómica	Sin recuperación	15	700	7, 16, 24 y 38°C
	Con recuperación	15	700	24 y 38°C

Estudio del daño subletal

El estudio del daño subletal de las células tratadas por PEF se divide en el efecto de la intensidad de campo y tiempo de tratamiento para una temperatura de entrada, y el efecto de la temperatura de entrada del producto para una combinación tiempo-intensidad de campo.

En el primer caso, se realizaron los mismos tratamientos que en el estudio cinético, mientras que en el segundo caso, se escogieron dos tratamientos (15 kV/cm; 700 y 1000 μ s) del estudio cinético que se observó mayor proporción de células dañadas y se estudiaron cinco temperaturas de entrada (7, 16, 24, 30 y 38°C).

Estudio de Electrotransformación

Se adicionó el plásmido pUC19 hasta una concentración final de 100 ng/ μ l. Previamente, se realizaron dos tipos de ensayos: primero, un ensayo sin adicionar el plásmido para comprobar la inexistencia de resistencia a la ampicilina; y segundo, un ensayo sin realizar tratamiento por PEAI de la suspensión con el plásmido, para corroborar que no se produce transformación espontánea.

Previo a cada tratamiento, el sistema de PEAI se esterilizó circulando 1,5 l de una disolución de hipoclorito sódico (6%) seguido de una circulación de 6 l de agua destilada estéril para limpiar el sistema. Para los estudios de electrotransformación se aplicaron 35 pulsos bipolares cuadrados de un ancho de 20 μ s (700 μ s de tiempo de tratamiento total) e intensidades de campo de 15, 20 y 30 kV/cm (157.5, 280, 630 J/mL respectivamente). Para estudiar el efecto de la temperatura, se realizaron los mismos tratamientos anteriores, pero modificando la temperatura de entrada del producto (7, 16, 24 y 30°C).

Para el recuento de células viables, las muestras se cogieron antes y después de cada tratamiento, se diluyeron en serie en agua estéril de peptona (0,1%), se sembraron en agar LB y se incubaron durante 48h a 37°C. Para los análisis de

electro-transformación, las células fueron recolectadas rápidamente por centrifugación a partir de 100 ml de suspensión celular, resuspendiéndolas en 10 ml de caldo SOC (Sambroock et al., 1989), incubándose 1 h a 37°C y sembrándolas en agar LB suplementado con ampicilina y X-gal. Por último, todas las muestras se incubaron a 37°C durante 48h. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

Estudio proteómico

En este estudio se ha analizado el perfil de proteínas de células de *E. coli* tratadas con PEF y PEF más una recuperación posterior de las células a temperatura óptima. En ambos casos, las muestras inoculadas fueron tratadas en las mismas condiciones (15 kV/cm y 700 μ s) pero a cuatro diferentes temperaturas iniciales de tratamiento (7, 16, 24 y 38°C). El ensayo de recuperación de las células tras el tratamiento por PEF consistió en una centrifugación (8000 rpm; 15 min; 4°C) de las células tratadas y una posterior resuspensión del pellet en LB broth. Esta suspensión se agitó en un shaker (37°C; 100 rpm) durante 1 hora previo al análisis proteómico.

IV.5.2.3 Recuento de las células viables.

Escherichia coli

Tanto las muestras tratadas como las no tratadas se diluyeron en serie en agua estéril peptonada al 0,1%, se sembraron en agar LB e incubadas durante 24 h a 37°C.

Lactobacillus casei

Tanto las muestras tratadas como las no tratadas se diluyeron en serie en agua estéril peptonada al 0,1%, se sembraron en agar MRS e incubadas durante 24 h a 37°C.

IV.5.2.4 Evaluación del daño subletal.*Escherichia coli*

El método más común usado para evaluar el daño subletal consiste en sembrar las células en dos medios de siembra, uno no selectivo, donde las células dañadas son capaces de recuperarse, y otro selectivo o estresante, donde las células dañadas no son capaces de recuperarse y mueren (Mackey, 2000). El recuento de las células dañadas se realiza por recuento diferencial de células entre ambos medios. La adición de cloruro sódico o sales biliares al medio de siembra es la metodología más habitual para crear medios selectivos (Mackey, 2000). En este estudio la evaluación del daño subletal se realizó por recuento diferencial de muestras sembradas en medio LB (1% triptona (Scharlau); 0.48% extracto de lavaduras (Merk); 0.25% NaCl) y medio LB estresante (LB-ST) (1% triptona (Scharlau); 0.48% extracto de lavaduras (Merk); 2.5% NaCl (Scharlau)), siendo la concentración de NaCl del 2.5% la concentración máxima para la cual no habían diferencias significativas entre los recuentos de las muestras sin tratar en LB y LB-ST.

Lactobacillus casei

Las muestras tomadas antes y después del tratamiento se diluyeron adecuadamente y se sembraron en placas con agar MRS o agar MRS suplementado con 0.3 M de sacarosa (SMRS).

IV.5.2.5 Técnicas moleculares.*Escherichia coli*

El plásmido pUC19 (portador de un marcador seleccionable de resistencia a la ampicilina) se usó para la electrotransformación de *E. coli*. El plásmido pUC19 se purificó mediante el kit “Plasmid Maxi Purification” (Qiagen, GmbH) según indicaciones del fabricante. Las técnicas moleculares se realizaron esencialmente como describe Sambrook (1989). La competencia de los cultivos se comprobó

mediante ensayos estándar de electroporación utilizando un aparato Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.), como describió Dower et al. (1988).

Se adicionó agar al 1,8% para sembrar. Para comprobar la posible electrotransformación se adicionó a las placas ampicilina (50 µg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-Dgalactopiranosido (X-Gal; 80 µg/ml).

Lactobacillus casei

El vector lanzador pIAβ8 (Pérez-Arellano y col., 2001), adecuado para el *E. coli* y para un amplio rango de bacterias Gram positivas, se utilizó en este estudio. Este plásmido lleva un determinante de resistencia al cloranfenicol que es funcional en el *L. casei*. El plásmido pIAβ8 fue propagado en *E. coli* DH5α (F-, ø80dlacZM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1) y purificado mediante el kit “Midi purification” (Qiagen, GmbH) según indicaciones del fabricante.

IV.5.2.6 Técnicas proteómicas.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS: Las células se recogieron por centrifugación (8000 rpm 15 minutos 4°C, en rotor SS-34 Sorvall). El pellet de células se resuspendió en 1 ml de tampon de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, Nonidet P-40 1% (v/v), Pharmalyte 3-10 1% (GE Healthcare) y Ditioteitol 2mg/ml) en un tubo de 2 ml y se añadió 0.5 g de *Zirconium beads (0.1mm diameter, Biospec)*.

Se rompieron las células agitando en un mini-beadbeater 12 veces 30 segundos con intervalos en hielo. Finalmente se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm y se recoge el sobrenadante.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: La concentración en proteínas totales se determinó utilizando el 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

Electroforesis bidimensional: Se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional (EF-2D) con el fin de separar la mezcla de proteínas presente en el

extracto proteico de *E. coli*. La electroforesis bidimensional de proteínas se realizó según el protocolo de Blomberg, A. (2002).

Primera dimensión, isoelectroenfoque.

El isoelectroenfoque (IEF) es un método capaz de separar las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI). Para ello, se cargaron, mediante rehidratación *overnight*, 50 µg de proteína total en Immobiline DryStrip Gels (GE Healthcare) de 18 cm con un rango de pH 3-10. El isoelectroenfoque se realizó en el sistema Ettan IPGPhor II (GE Healthcare) utilizando el programa: gradiente de 5 horas hasta 500 V, 5 horas a 500 V, 9.5 horas en gradiente hasta 3500 V, 2 horas a 3500 V.

Segunda dimensión, SDS-PAGE

En esta etapa, las proteínas se separaron según su peso molecular (Pm). Para ello, re utilizó el sistema *Ettan DALTsix Large Vertical System*. Se realizaron geles de Acrilamida-bisacrilamida (12.5T, 2.2C). La SDS-PAGE se desarrolló durante 16 horas a 6 Watts (1W/gel)

Tinción de plata. Los geles se tiñeron con Nitrato de plata, con un protocolo compatible con espectrometría de masas. Fijación durante 2 horas en etanol:acético:agua (50:10:40), lavados con agua durante una hora, DTT 0.02% 30 minutos, Nitrato de plata 0.1% 30 minutos, revelado con carbonato sódico 2% y formaldehído 0.04%. El revelado se para con ácido acético 1%.

Análisis de imagen. Se realizó el análisis estadístico y cuantitativo de los geles utilizando el programa PD-Quest (BioRad). El análisis estadístico se realizó al 95% de confianza y el cuantitativo considerando significativos cambios en +/- 2 veces.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La identificación de proteínas se realizó en el Servicio de Proteómica del CNIC. Las proteínas fueron identificadas mediante su huella peptídica (*Peptide Mass Fingerprint*) y en los casos en los que no se obtuvo resultado, mediante secuenciación de un pequeño fragmento de la proteína con MS/MS.

Digestión de las proteínas del gel

Las piezas de gel con la proteína se separaron manualmente para, a continuación, digerirlas automáticamente usando una estación de digestión de proteínas “Proteiner DP” (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). El protocolo de digestión se usó el descrito por Schevchenko et al. (1996) con mínimas variaciones: las piezas de gel se sometieron a una reducción con ditioneol (10 mM) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) en bicarbonato amónico (50 mM) (99.5% purity; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) y se alquilató con iodoacetamida (55 mM) (Sigma Chemical) en bicarbonato amónico (50 mM). Las piezas de gel se lavaron con bicarbonato amónico (50mM) y acetonitrilo (Merck, Darmstadt, Germany) y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI, USA) a una concentración de 8 ng/μl en bicarbonato amónico (50 mM) se adicionó a las piezas de gel secas, procediéndose a la digestión a 37 °C durante 6 h. Finalmente se adicionó ácido trifluoroacético (0.5%) (99.5% pureza; Sigma Chemical) para la extracción de los péptidos.

MALDI-MS(/MS) y búsqueda en la base de datos

Una alícuota de la solución de la digestión anterior se mezcló con una alícuota de ácido α- ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) en acetonitrilo acuoso al 33% y ácido trifluoroacético al 0.25%. Esta mezcla se depositó en una sonda “AnchorChip prestructured MALDI” (Bruker-Daltonics) a 600 nm y dejándola que se seque a temperatura ambiente. Los datos del MALDI-MS(/MS) se obtuvieron

mediante un análisis automático en bucle mediante un espectrómetro de masas TOF “Ultraflex” (Bruker-Daltonics) equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS. Los espectros fueron adquiridos en el modo ión positivo con una frecuencia de láser de 50 Hz y con un promedio de 100 a 1000 espectros individuales. Para el análisis de fragmentos de iones en el modo TOF/TOF, los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados en una puerta de tiempo de iones. Los fragmentos de iones generados por la descomposición del precursor inducida por el láser se aceleraron a 19 kV en la célula LIFT y sus masas fueron analizadas tras pasar por el reflector iónico. Los análisis automatizados de los datos de las masas se llevaron a cabo mediante el software “flexAnalysis” (Bruker-Daltonics). La calibración interna del espectrómetro de masas MALDI-TOF se llevó a cabo mediante dos autolisis iónicas de tripsina con $m/z = 842.510$ y $m/z = 2211.105$; mientras que para las calibraciones del MALDI-MS/MS, se realizaron con espectros de fragmentos iónicos obtenidos de los aductos de protones de una mezcla de protones cubriendo la región 800-3200 m/z . Los datos del MALDI-MS y del MS/MS se combinaron mediante el programa BioTools (Bruker-Daltonics) para buscar en una base de datos de proteínas no redundantes (NR; $\sim 4 \times 10^6$ entradas; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US) usando el software “Mascot” (Matrix Science, London, UK). Los espectros del MALDI-MS(/MS) y los resultados en la base de datos se inspeccionaron manualmente usando, tanto los programas antes descritos como mediante un software propio.

IV.5.2.7 Estudio cinético y análisis de datos.

Como primera etapa del estudio y para caracterizar la Resistencia a los PEAI del *E. coli* DH5 α , las células crecidas en las condiciones anteriormente descritas fueron tratadas por PEAI y los resultados obtenidos ajustados a los siguientes modelos de inactivación:

Hülsheger (Hülsheger et al., 1981):

$$\ln(S) = -b_t * \ln\left(\frac{t}{t_c}\right) \quad (\text{Ec.IV.5.1})$$

donde b_t es el coeficiente de regresión, t es el tiempo de tratamiento en μs y t_c es el tiempo crítico expresado en μs (tiempo de tratamiento máximo donde la fracción de supervivientes es 1).

Weibull (1951):

$$\ln(S) = -\left(\frac{t}{a}\right)^b \quad (\text{Ec.IV.5.2})$$

donde a y b son los parámetros de escala y forma, respectivamente.

La bondad del ajuste de los datos experimentales de los modelo se midió por medio del Mean Square Error (MSE).

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SPSS 12.0[®].

IV.5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.5.3.1 Estudio de daño subletal y generación de transformantes de *L. casei*.

Los resultados obtenidos en este estudio para las condiciones de tratamiento T1, T2 y T3 (ver Tabla IV.5.1), y usando las células preparadas por el procedimiento estándar, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los recuentos obtenidos en MRS y SMRS (Tabla IV.5.3). Por tanto, no existe evidencia de daño subletal en células que no hayan sido pre-acondicionadas para la electroporación. Por el contrario, las células de *L. casei* que recibieron dicho acondicionamiento (tratamiento 4, Tabla IV.5.1) mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los recuentos obtenidos en MRS y SMRS, y por tanto se confirma un daño subletal. El ratio de inactivación en MRS era de 0,42, aumentando a 0,56 en SMRS (Tabla IV.5.3). Es evidente que una proporción significativa de la población requiere de protección osmótica para que se produzca

el crecimiento, lo que indica que el daño surge como consecuencia del tratamiento por PEAI, en las condiciones estudiadas.

Tabla IV.5.3. Efectos de los diferentes tratamientos por PEAI en la recuperación de células de *Lactobacillus casei*.

Inóculo	Medio siembra	Fracción de células recuperadas (N_f / N_o^1)			
		T1 ²	T2 ²	T3 ²	T4 ²
<i>L. casei</i>	MRS + antibiótico	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
<i>L. casei</i> + Plásmido	MRS	0,03125	0,00015	0,08120	0,42700*
	SMRS	0,03142	0,00013	0,08120	0,56300*
	MRS + antibiótico	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

¹ N_f = Recuento Final (cfu/ml)

N_o = Recuento Inicial (cfu / ml).

² T1, T2, T3, T4 = Tratamientos por PEAI (ver Tabla IV.5.2).

* Diferencias estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre los valores.

Se llevaron a cabo una serie de experiencias para determinar si el tratamiento por PEAI puede conllevar una transformación del *L. casei*. Para este propósito, las células fueron suspendidas en agua peptonada, se adicionó el plásmido y por último se realizó el tratamiento (Tabla IV.5.1). Bajo estas condiciones, no se recogieron organismos en agar SMRS + cloranfenicol (Tabla IV.5.3), y por tanto no hay transformantes. Dado que la eficiencia de la electro-transformación depende de tratamientos previos en las células, se llevaron a cabo tratamientos por PEAI en células que habían sido cultivadas y preparadas por un procedimiento adecuado para la electro-transformación. De igual modo, no se detectaron transformantes.

Debido a los resultados anteriores, se llevaron a cabo nuevos ensayos para comprobar si las células eran transformables. Alicuotas de cada una de las suspensiones, preparadas como se describió anteriormente, se descongelaron y diluyeron hasta alcanzar la concentración de células necesaria para realizar los ensayos por PEAI. A continuación, se adicionó el plásmido de igual modo que en las experiencias anteriores. En estos ensayos, se obtuvo la típica frecuencia de transformación de 1×10^{-6} transformantes / número total de células.

En resumen, los resultados muestran que las suspensiones de células de *L. casei*, preparadas mediante el procedimiento estándar para la electrotransformación, y dañadas subletalmente debido a los tratamientos por PEAI, aun así, no presentan transformantes. Estos resultados sugieren que el riesgo de los PEAI en inducir transformación en *L. casei* es muy bajo.

IV.5.3.2 Estudio de la posibilidad de adaptación de *E. coli*.

IV.5.3.2.1 Cinéticas de inactivación

Como primer paso del estudio se caracterizó la resistencia a los PEAI del *E. coli* DH5 α (Fig. IV.5.1). Con el tratamiento más intenso (30 kV/cm, 5612 μ s) se obtuvieron casi seis reducciones logarítmicas de inactivación. Como se ha comprobado en numerosos estudios, un incremento de la intensidad de campo implica un menor índice de supervivencia del organismo. Las curvas de supervivencia obtenidas muestran que a tiempos cortos, las curvas siguen una cinética de primer orden, mientras con el aumento del tiempo, las curvas se alejan de una tendencia lineal, en este caso presentando una tendencia cóncava hacia arriba, también llamada cola. La presencia de desviaciones, hombros o colas, en las cinéticas de primer orden es un fenómeno frecuente en las tecnologías emergentes de conservación (Cheftel, 1995). Estas desviaciones podrían ser explicadas más como una distribución de resistencias en la población microbiana en lugar de una cinética de inactivación de distinto orden (Peleg and Cole, 1998). Por tanto, la

curva de supervivencia puede ser considerada como resultado de una secuencia de eventos letales, siendo, por tanto, la inactivación de microorganismos descrita como una función de distribución, pudiendo ser un ejemplo la distribución de Weibull.

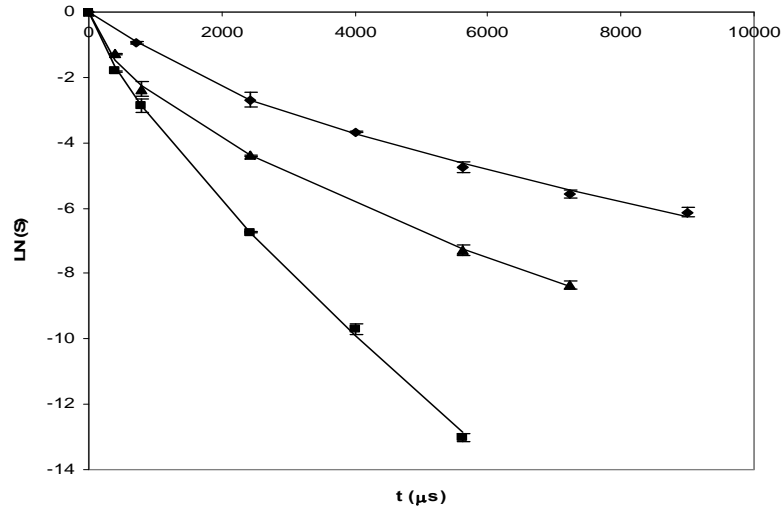


Figura IV.5.1 Curvas de supervivencia para *E. coli DH5α* a diferentes intensidades de campo eléctrico, 15 kV/cm (◆), 20 kV/cm (▲) y 30 kV/cm (■). Datos experimentales ajustados a la función de distribución de Weibull.

Se usaron dos modelos para describir los datos experimentales de inactivación de *E. coli* (Tabla IV.5.4): la función de distribución de Weibull (Weibull, 1951), que considera que los microorganismos presentan una distribución de resistencias, y el modelo de Hülshager (Hülshager et al., 1981) ya usado por otros autores (Martín-Belloso et al., 1997) para describir las 'curvas de inactivación por PEAI que no siguen una cinética de primer orden. Los parámetros cinéticos de ambos modelos tienen tendencia específica; disminuyen al aumentar la intensidad de campo eléctrico (Tabla IV.5.4), y por tanto, se pueden considerar como una medida de la resistencia del *E. coli* al tratamiento. Ambos modelos presentan valores bajos

de MSE para todas las intensidades de campo, siendo menores para el modelo de Weibull. En consecuencia, el modelo de Weibull es la función de distribución que mejor describe los datos experimentales.

Tabla IV.5.4 Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar los modelos de Weibull (a) y de Hülshager (b) a los datos experimentales.

(a)

E (kV/cm)	a	b	MSE
15	531,73±86,11	0,6492±0,0799	0,0122
20	209,17±47,81	0,6012±0,0952	0,0149
30	206,27±41,84	0,7733±0,0808	0,0216

(b)

E (kV/cm)	b_t	LN t_c	MSE
15	2,041±0,9718	6,274±1,218	0,1754
20	2,413±0,9962	5,635±1,475	0,3811
30	4,0514±1,4729	5,794±1,849	1,9934

IV.5.3.2.2 Estudios de transformación

Varios estudios han evidenciado que la eficiencia de la electro-transformación depende en gran medida del tratamiento previo de las células (McIntyre y Harlander, 1989). Por tanto, con el fin de evaluar la posibilidad de electro-transformación debido a los PEAI, los tratamientos se realizaron con células preparadas siguiendo el procedimiento estándar para la electro-transformación de *E. coli*. Con el objeto de determinar si esas células eran electro-transformables, se llevaron a cabo ensayos estándar de electro-transformación. Para ello, se diluyeron alícuotas de cultivo preparadas según el procedimiento anteriormente descrito hasta una concentración final similar a la usada en los tratamientos por PEAI. De igual modo, el plásmido se adicionó hasta la misma concentración. Las frecuencias de

transformación obtenidas en estos ensayos son las típicas de estos microorganismos (aproximadamente de 5×10^{-3} transformantes/células totales).

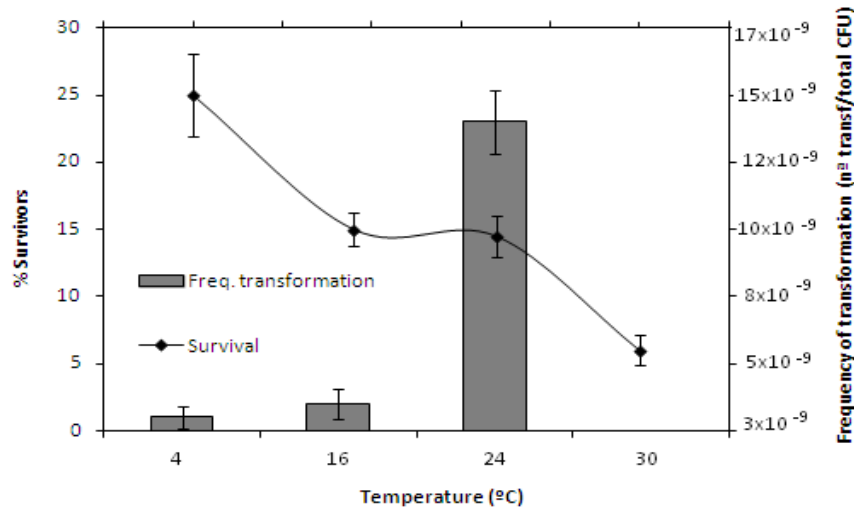


Figura IV.5.2 Ratio de supervivencia y frecuencia de transformación de *E. coli DH5a* tratada por PEAI a diferentes temperaturas de entrada. El tratamiento por PEAI es de 15 kV/cm y 700 μ s. Los resultados se obtienen como una media de tres experimentos y las desviaciones estándar se indican como barras de error.

Un estudio previo centrado en la creación de un procedimiento de electrotransformación para el *E. coli* señaló, que para tasas de supervivencia comprendidas en el rango de 10 a 50%, se obtenía una mayor frecuencia de transformación (Dower y col., 1988). Por tanto, basándose en la caracterización cinética del microorganismo, se eligió para las siguientes experiencias un tiempo de tratamiento de 700 μ s. Mientras que con los tratamientos a 20 o 30 kV/cm no se observó crecimiento alguno de colonias sembradas con ampicilina, indicativo de la inexistencia de transformantes, a 15 kV/cm, se observó un número bajo de colonias. Los análisis del contenido del plásmido, de las muestras tratadas a 15kV/cm, mediante análisis enzimático de restricción confirmaron la presencia del pUC19. No se aislaron colonias en los ensayos control, ya sea cuando no se

adicionó el plásmido o se adicionó pero no se trató por PEAI. Por todo lo anterior, se concluye que la transformación ocurrida es consecuencia únicamente del tratamiento por PEAI.

También se estudió el efecto de la temperatura de entrada en la frecuencia de transformación (Fig. IV.5.2). Es bien conocido que la supervivencia de las células sometidas a idénticos tratamientos por PEAI, disminuye al aumentar la temperatura. Destaca el incremento de la frecuencia de transformación de 3×10^{-9} transformantes/ufc totales a 16 °C hasta 15×10^{-9} transformantes/ufc totales a 24 °C, a pesar de que solo se observe una ligera diferencia de la supervivencia. Estos resultados corroboran con los obtenidos por Miller y col. (1988), donde observaron que la temperatura de la muestra era un factor importante durante la electroporación. Para electroporaciones a 5,25 kV/cm y temperatura del medio de 22°C obtuvieron una eficiencia de transformación de $5 \pm 0,9 \times 10^{-3}$ transformantes/ μ g mientras que a 4°C obtuvieron una eficiencia de $3,3 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ transformantes/ μ g (Miller y col., 1988). Estos resultados sugieren un efecto sinérgico de la temperatura en la eficiencia de transformación.

IV.5.3.2.3 Estudio del daño subletal.

Una importante línea de investigación en la conservación de alimentos es la llamada “tecnología de barreras”, que es la combinación de tecnologías de conservación (tecnologías térmicas y no térmicas) con otros factores de conservación (actividad de agua, temperaturas de refrigeración y congelación, pH) disminuyendo de este modo la intensidad de los tratamientos de conservación y aumentando la calidad del alimento sin merma de la seguridad del mismo. Tras la aplicación de los PEF como de cualquier otra tecnología de conservación en un alimento, las consecuencias del tratamiento sobre la flora presente se puede agrupar en: 1) Sin daño (microbiota sana); 2) con daño subletal (microbiota dañada y susceptible de recuperarse en condiciones óptimas); 3) con daño letal (microbiota

muerta). El conocimiento de la proporción de células vivas y dañadas que produce los PEF en una población de microorganismos es fundamental en la implantación de “tecnologías de barrera” ya que son los microorganismos más sensibles a un posterior estrés (Wuytack y col. 2003). Recientes demostraciones de la aparición de células dañadas ofrece la posibilidad de combinar de forma sinérgica los PEAI y otras barreras, de forma que se incremente la inactivación microbiológica a la vez que se minimice los efectos negativos tanto en la calidad del alimento como las necesidades energéticas (García y col., 2005; Solominos y col., 2008; Pina et al., 2009). La no consideración de los factores que afectan a la resistencia microbiológica puede llevar a malinterpretaciones de resultados y conclusiones erróneas en relación con el daño celular.

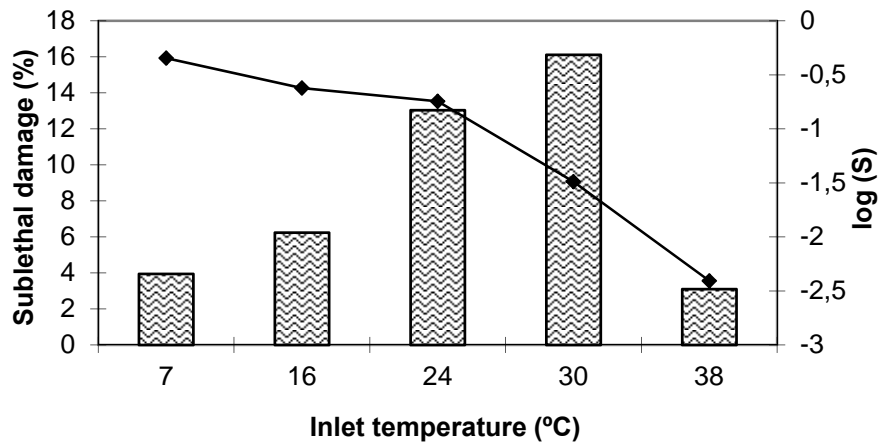


Figura IV.5.3. Efecto de la temperatura de entrada en la inactivación (línea) y en la proporción de células dañadas (columnas) de *E. coli* suspendidas en glicerol y tratadas por PEF (15 kV/cm; 700 μs).

Debido a la naturaleza del mecanismo de muerte en células sometidas a un tratamiento por PEF (formación de poros en la membrana plasmática y duración de los mismos), se realizaron estudios de daño subletal en las mismas condiciones de

tratamiento que el estudio de transformantes, y así establecer una posible existencia de una relación entre número de células transformadas y la proporción de células dañadas.

Respecto a la evolución de la inactivación alcanzada se observa un aumento de la misma ($p \leq 0,05$) al incrementarse la temperatura, pudiéndose considerar una relación de sinergismo PEF-temperatura ya que la temperatura máxima de tratamiento alcanzada (45°C) no tiene un efecto pasteurizante. La relación de sinergismo entre temperatura de tratamiento e inactivación por PEF es ampliamente conocida (Korolczuk et al., 2006; Sensoy et al., 1997; Liang et al., 2002), siendo una estrategia válida para incrementar la efectividad de esta tecnología.

La Figura IV.5.3 muestra el número de ciclos logarítmicos de inactivación de *E. coli* DH5 α suspendidos en glicerol frío (10%) obtenidos tras el tratamiento por PEAI a 15 kV/cm y 700 μs y cinco temperaturas de entrada (7, 16, 24, 30 and 38°C) y el daño subletal de las células viables (expresado como %). Para las temperaturas de tratamiento iniciales, comprendidas entre 7 y 30°C , se observa un incremento de la proporción de células dañadas en la población de células viables hasta un máximo del 16% para 30°C , disminuyendo al aumentar la temperatura inicial a 38°C ($p \leq 0,05$). Es bien sabido que la fluidez de la membrana plasmática depende, entre otros factores, de la temperatura ambiental. Los resultados de la figura IV.5.3 muestran que la membrana del *E. coli* resiste mejor al tratamiento por PEF, tanto a nivel de inactivación como de daño subletal, a temperaturas iniciales inferiores a 16°C . Esta resistencia puede ser debido a una baja fluidez de la membrana siendo un impedimento para la electroporación de la misma. A medida que aumenta la temperatura (de 16 a 30°C) se observa un aumento del daño y de la inactivación, siendo 30°C la temperatura óptima donde el microorganismo presenta una mayor proporción de células dañadas. El efecto de “todo o nada”, y por tanto la ausencia de daño subletal en la temperatura de 38°C se puede explicar por el

aumento de la fluidez que influye en la formación de grandes poros y la incapacidad de la célula de repararlos. Los resultados obtenidos confirman la mayor efectividad de la electroporación al aumentar la temperatura (Zimmermann, 1986). Lebovka y col. (2005) observó que la electroporación era más efectiva a temperaturas próximas a 50°C cuando tejidos de remolacha y patata eran sometidos a PEAI.

Existen estudios contradictorios en la generación de células dañadas de microorganismos tras la aplicación de los PEF. Mientras Simpson y col. (1999), Dutreux y col. (2000 a, b), Russell y col. (2000), Ravishankar y col. (2002), Ulmer y col. (2002), Wuytack y col. (2003) and Aronsson y col. (2004) no observan un daño subletal tras el tratamiento por PEF, Arroyo et al., (2010), García et al. (2003), Unal et al. (2002), García et al. (2005) y Pina et al. (2009) han demostrado que el tratamiento por PEF produce daño subletal en grandes proporciones en poblaciones tanto de microorganismos Gram positivos como Gram negativos. García et al. (2003) muestran la influencia del pH del medio en el daño subletal al tratar *E. coli* suspendido en tampón citrato-fosfato, obteniendo un daño del 99,95% a pH 4 mientras que a pH 7 el daño es mínimo. Este efecto del pH también se observa en otros microorganismos Gram negativo (*Salmonella serotypes Senftenberg 775W*), sin embargo en el caso de los Gram positivo, la proporción de células dañadas aumenta al aumentar el pH (García et al. 2005). Por tanto la baja proporción de daño subletal alcanzado en este estudio, respecto a otros estudios, puede ser debido al pH del medio, siendo próximo a 7.

La figura IV.5.4 compara el efecto de la temperatura de entrada en la frecuencia de transformación y en la proporción de células vivas dañadas. Se observa que para la temperatura (24°C) donde se alcanza la mayor frecuencia de transformación, el daño subletal es del 13,6%. Cuando se aumenta la temperatura hasta 30°C se alcanza el máximo de daño subletal (16%), sin embargo no se han formado transformantes. Se conoce con seguridad que la aparición de células

transformantes es debida a la formación de poros en la membrana plasmática. Sin embargo, en el caso del daño subletal es debido a diferentes aspectos, siendo el efecto sobre la membrana plasmática uno de ellos. La ausencia de transformantes a 30°C, a pesar de alcanzarse el máximo de daño subletal, muestra la inexistencia de una relación proporcional entre la generación de transformantes y el daño subletal al variar la temperatura de tratamiento. Este comportamiento puede deberse a una variación de la importancia de los aspectos que influyen en el daño cuando se incrementa la temperatura en el tratamiento por PEF.

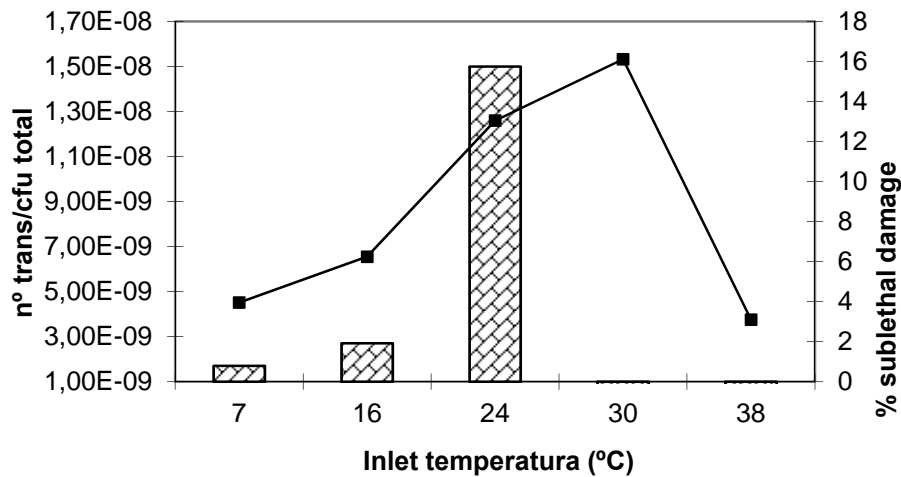


Figura IV.5.4 Daño subletal (línea) y frecuencia de transformación (columna) de *E. coli* DH5α tratada por PEF a diferentes temperaturas de entrada.

El aumento en la proporción de células dañadas va también acompañado de un aumento en la inactivación, como se ha comentado anteriormente (Figura IV.5.4). Este aumento en la inactivación puede explicar la no formación de transformantes, para las temperaturas más elevadas. De 24°C a 30 °C la inactivación sigue aumentando, la formación de transformantes deja de producirse, y el daño subletal alcanza su máximo valor. Es posible que la formación de mayor cantidad de poros

o poros más grandes se produzca como resultado del efecto sinérgico PEF+temperatura, este aumento da lugar a un incremento en la población subletalmente dañada y también a un aumento de la población irreversiblemente dañada que muere (aumento de la inactivación). En estas condiciones de tratamiento, puede que nos encontremos ante condiciones idóneas para orientar el estudio hacia posibles incrementos en inactivación (Aronson et al., 2001) pero ante condiciones muy intensas o propicias puede dar lugar a electroporaciones insostenibles en cuanto a la formación de electrotransformantes, electroporaciones con pérdida de la integridad celular, alteraciones importantes en transporte transmembrana, pérdida de orgánulos celulares, pérdida de capacidad replicativa, etc. Aumentando la temperatura entre 30 y 38 °C la hipótesis comentada se sostiene. A medida que aumentamos la temperatura en combinación con el tratamiento por PEAI, aumenta la presión ejercida sobre las células de *E. coli* de modo que se reduce la población de células dañadas, la inactivación-muerte sigue aumentando, y la formación de electrotransformantes sigue siendo nula. Esta hipótesis está de acuerdo con Miller et al. (1988), que observaron que tanto el incremento en la intensidad de campo como en la exposición a esa intensidad implica una mayor frecuencia de transformación, siendo limitado este incremento por la letalidad del tratamiento.

Otra explicación a la ausencia de transformantes a 30°C, a pesar de alcanzarse el máximo de daño subletal, sería la menor disponibilidad de células dañadas susceptibles de ser transformadas. Debido a que referimos el daño subletal como una proporción respecto de las células vivas, el incremento de la inactivación que se observa a 30° C (próximo a un ciclo superior respecto a 24°C), implica que, aunque tengamos un 16% de daño, el número de células dañadas sea prácticamente diez veces menor a las obtenidas para 24°C.

IV.5.3.2.4 Estudio de proteómica

Los microorganismos al ser sometidos a un estrés externo (estrés térmico, incremento de la acidez, disminución de la actividad de agua del medio,...), reaccionan generando unas proteínas que les confieren “resistencia” o “adaptación” a ese estrés (Abee and Wouters, 1999). En el caso del estrés térmico, los microorganismos reaccionan induciendo la síntesis de un grupo altamente conservado y específico de proteínas conocidas como “proteínas de estrés calórico” (PEC). Las principales PEC son chaperonas cuya función es catalizar el plegamiento correcto de las proteínas y proteasas que degradan a proteínas desplegadas, manteniéndose así el control sobre el sistema proteico de la célula (Gottesman et al., 2000). Además, la exposición a estreses diferentes al térmico (exposición a etanol, a ácidos, etc.), con su consiguiente inducción de PECs (Arsene et al., 2000), puede dar como resultado un incremento en la termotolerancia del organismo. El entendimiento de la adaptación a diferentes estreses y la participación de las proteínas en dicha adaptación puede ser decisivo en la optimización de las condiciones del procesado para garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos (Bower et al., 1999).

En el caso del *E. coli*, cuando es sometido a un estrés térmico comprendido entre 30 y 42°C, reacciona induciendo una rápida síntesis de 20 PECs, seguido de un periodo donde la velocidad de síntesis decrece hasta alcanzar un nuevo nivel de estabilidad (Bukau, 1993).

Además del calor, hay otros estímulos capaces de inducir la síntesis de las PEC. Estos estímulos incluyen, entre otros, a infecciones por virus, radiaciones UV, cambios en osmolaridad, oxigenación, pH y nutrientes, presencia de sustancias tóxicas como etanol, metales pesados y algunos antibióticos. Cada estímulo determina una respuesta particular en cuanto a nivel de inducción, cinética y PEC que induce. El inductor más potente es el calor mismo, el cual induce la expresión de todo el repertorio de PEC, mientras que la mayoría de los otros estímulos

inducen la expresión de sólo algunas de estas proteínas (Krueger y Walker, 1984; Nover, 1991; VanBogelen y col., 1987).

El estudio de proteómica del *E. coli* se enfocó desde dos puntos de vista: 1) Estudio de la variación del perfil proteico por la combinación pulsos eléctricos – temperatura; 2) Estudio del mantenimiento de la variación del perfil proteico. Para el estudio de la variación del perfil proteico debido a la combinación temperatura-PEF se realizaron los mismos tratamientos que en los estudios de transformantes y de daño subletal. El estudio del mantenimiento de esas variaciones se realizó mediante una recuperación de las células (37°C, 1 hora) tras los tratamientos (a 24°C y 38°C).

EF sin recuperación

Para detectar la posible modificación en el perfil proteico atribuido al tratamiento por PEAI combinado con temperatura, se llevó a cabo el presente estudio de *E. coli* tratadas y sin tratar. La figura V.5.5 muestra las imágenes de los geles de electroforesis del perfil proteico del *E. coli* control (sin tratamiento) y tras un tratamiento por PEF (15 kV/cm, 700µs y 24°C).



Figura IV.5.5. Imágenes de los geles de electroforesis 2D del perfil proteico del *E. coli* control (a) y tratado por PEF (b).

Los resultados obtenidos con el análisis informático de los geles 2D-Electroforesis de las muestras tratadas por PEAI (4 temperaturas) permiten observar la existencia de “spots” comunes que han sufrido variación en su intensidad. Concretamente se han encontrado siete “spots” que varían significativamente en las cuatro condiciones respecto a la muestra control. Los “spots” que cumplían estos requisitos se recortaron del gel para su identificación mediante espectrometría de masas obteniéndose un 100% de identificaciones.

En la tabla y gráficos se muestra la razón a las diferentes temperaturas respecto al control.

Tabla IV.5.5 Valores de los ratios de las proteínas de *E. coli* tras los tratamientos por PEF sin recuperación respecto al control.

Spot nº	protein	Ratio to control			
		7°C	16°C	24°C	38°C
1204	gmhA	4,42	2,38	8,17	5,19
3206	clpA	8,13	6,3	13,78	11,09
3321	ompA	0,13	0,03	0	0
5231	RS6	6,59	7,44	5,11	4,29
5237	RS6	8,01	7,52	5,16	3,24
6215	dut	5,68	4,94	6,35	6,17
8209	ftnA	4,42	6,48	6,39	6,96

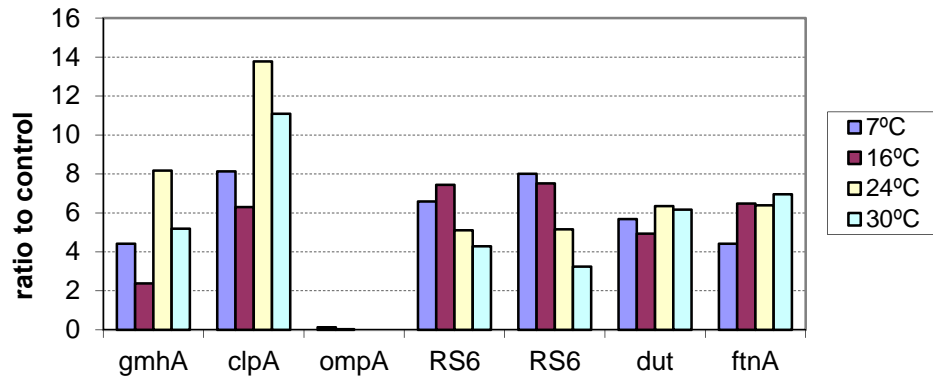


Figura IV.5.6. Evolución de los valores de los ratios de las proteínas de *E. coli* tras los tratamientos por PEF sin recuperación respecto al control.

La información sobre la función de las proteínas identificadas se realizó en las bases de datos públicas UniProt (<http://uniprot.org>) y GenProtEC (<http://geneprotec.mbl.edu>).

De las siete proteínas identificadas solo una, *ompA*, posee niveles inferiores (a 7°C y 16°C) al control e incluso es inexistente (a 24°C y 38°C). *OmpA* es una proteína de la membrana externa, una de las estructuras más dañadas por los PEF, lo cual puede explicar su desaparición en los perfiles de proteínas. En los análisis de las células sometidas a PEF (temperatura 24°C) más recuperación, una de las proteínas identificadas cuyo nivel aumenta significativamente respecto al control pertenece a la misma familia (ver tabla IV.5.5), lo que nos indica que durante la recuperación de las células se inicia la síntesis de esta proteína, probablemente con el fin de recuperar la integridad de la membrana externa.

El resto de proteínas identificadas, cuyos niveles aumentan tras los tratamientos por PEF son:

- *gmhA*, una fosfoheptosa isomerasa, implicada en la biosíntesis del lipopolisacárido de la pared celular.

- *ClpA*, una proteasa implicada en la degradación de proteínas no plegadas o anormales.
- *RS6*, la proteína ribosomal S6 de la subunidad 30S del ribosoma, implicada por lo tanto en la etapa de traducción de la biosíntesis de proteínas.
- *Dut*, es el enzima deoxiuridina 5'-trifosfato nucleotido hidrolasa, produce dUMP y está por lo tanto implicada en el metabolismo de ácidos nucleicos.
- *FtnA*, es una ferritina, proteína implicada en el almacenamiento de hierro y que se ha descrito está implicada en adaptación al estrés de las células.

Así, son proteínas cuyas funciones están relacionadas con la recuperación de funciones y estructuras celulares después del estrés sufrido por los PEF.

PEF con recuperación

En este estudio se compararon los perfiles de proteínas de células sometidas a PEF a dos temperaturas finales, 24°C y 38°C más un tratamiento de recuperación posterior, a 37°C durante 1 hora. El análisis se realiza como se ha descrito anteriormente.

Tabla IV.5.6 Valores de los ratios de las proteínas de *E. coli* tras los tratamientos por PEF con recuperación respecto al control.

Spot nº	Protein	Ratio to control	
		24°C	38°C
2408	cysK	0.48	0.4
4203	wrbA	0.27	0.26
6512	tufB	17.32	35.26
7511	deoB	0.29	0.26

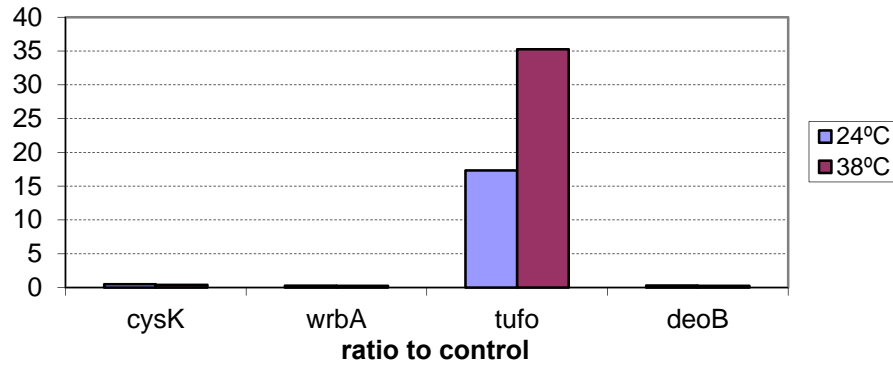


Figura IV.5.7. Evolución de los valores de los ratios de las proteínas de *E. coli* tras los tratamientos por PEF con recuperación respecto al control.

Tras la revisión *de visu* de los resultados proporcionados por el programa PD-Quest se obtienen 4 puntos comunes a las dos temperaturas que varían significativamente respecto al control. Estos puntos son identificados por MS.

El análisis mostró también determinados puntos cuyos niveles varían significativamente solo a una de las dos temperaturas finales, considerando relevante la identificación de estos puntos (Tabla IV.5.7 y Tabla IV.5.8).

Tabla IV.5.7. Valores de los ratios de las proteínas de *E. coli* tras los tratamientos por PEAI a 24°C con recuperación respecto al control.

Spot n°	Protein	Ratio to control 24°C
0910	NI	2,10
2711	ftsH	2,18
4503	NI	2,50
4602	NI	3,03
5308	omp	5,54
7202	ABC transporter	0,13
7607	putA	2,73
7702	lysU	0,50

NI. No identificada

Entre las proteínas cuyos niveles aumentan tras el tratamiento de PEF más recuperación se encuentra:

- *TufB*, perteneciente a la familia EF-Tu de factores de elongación de la traducción.
- Las proteínas *ftsH* y *omp* son ambas proteasas localizadas en la membrana externa.
- *surA* es una carabina molecular, implicada en plegamiento correcto de proteínas, también ubicada en la membrana externa.
- La proteína *putA* pertenece a la familia de aldehído deshidrogenasas NAD-dependientes, genera poder reductor en forma de NADH, el cual es necesario para la respiración aeróbica.
- Relacionados con la respiración también se encuentran aumentados los niveles de las proteínas *atpA*, implicada en la síntesis de ATP y *sdhA*, perteneciente al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Tabla IV.5.8. Valores de los ratios de las proteínas de *E. coli* tras los tratamientos por PEF a 38°C con recuperación respecto al control.

Spot nº	Protein	Ratio to control 38°C
2606	atpA	2,76
3605	atpA	2,13
3713	sdhA	3,34
6406	prsA	3,66
7602	aspA	0,41
7605	gpmI	0,46
8211	ptgA	0,39
8712	surA	4,32

Entre las proteínas cuyos niveles disminuyen tras el tratamiento se encuentran varias proteínas implicadas en el metabolismo celular como proteínas de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos cisteína (*cysK*), aspartato (*aspA*) y triptófano (*wrbA*), el enzima fosfoglicero mutasa (*gpmI*) de las rutas de glucólisis y gluconeogénesis, y *ptgA*, implicada en la fosforilación y transporte de la glucosa al interior celular y un transportador de tipo ABC.

Tradicionalmente, se ha explicado el mecanismo de inactivación microbiológica por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad como un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, también llamado electroporación. Básicamente, la célula sometida a los PEAI sufre una serie de modificaciones que se pueden dividir en: un aumento del potencial transmembrana; generación de poros en la misma; evolución del número y tamaño de los poros; cerrado o no de los poros al desaparecer el estrés (intensidad de campo). Por tanto, centrándose principalmente en el efecto de los PEAI en la bicapa lipídica. Sin embargo, debido a la presencia de otras moléculas en la membrana plasmática (glúcidos y proteínas principalmente) diferentes a los fosfolípidos, cabe pensar que puedan ser afectados por los PEAI.

La proteómica examina los niveles de las proteínas y sus cambios en respuesta a diferentes genotipos y condiciones. El estudio proteómico realizado muestra, para tratamientos suaves de PEAI e independientemente de la temperatura inicial, la existencia de modificaciones en ciertas proteínas. Principalmente se observa una destrucción parcial o total de la proteína *ompA*, en función de la temperatura. Dicha proteína está situada en la parte externa de la membrana citoplasmática y actúa como una porina, permitiendo la entrada de pequeños solutos (Tonella y col., 2001; Han y Lee, 2006). Por tanto, los PEAI afectan al intercambio de moléculas de la célula con el exterior desde dos puntos de vista, por una parte por la generación de poros en la membrana plasmática con la

pérdida consecuente de metabolitos y por otra parte afectando a las proteínas canal. Estudios realizados por Wemekamp-Kamphuis y col. (2004) y por Somolinos y col. (2010) demuestran que el mecanismo de inactivación por PEAI es diferente a los mecanismos por calor o por altas presiones.

Es bien sabido que los estreses ambientales y los métodos de conservación, tales como el calor o los PEAI, inducen respuestas de adaptación en las células (Wesche y col. 2009). En nuestro estudio, el resto de las proteínas afectadas se relacionan con los mecanismos de recuperación, tanto de las funciones propias de la célula como de la membrana plasmática, cuando la célula se somete a un estrés.

En las células de *E. coli* sometidas a los PEAI y después recuperadas en condiciones óptimas (37°C- 1 hora), se observa, en general, que las proteínas que han sufrido un cambio de intensidad son diferentes a las células tratadas sin recuperación. Sin embargo cabe destacar el incremento de nivel de las proteínas de membrana (*omp* y *FtsH*) en las células recuperadas, indicativo de la recuperación de la célula, concretamente, de la membrana plasmática.

IV.5.4 CONCLUSIONES

Estudios realizados en los últimos años sobre inactivación microbiológica por PEAI, han ido alejando la idea de que la inactivación sigue siempre un proceso de “todo” o “nada”. La aplicación de la doble siembra (en medio selectivo-medio no selectivo) o mediante otras técnicas han mostrado que tras la aplicación de tratamientos suaves por PEAI, puede aparecer un porcentaje de la población superviviente dañada subletalmente, que puede evolucionar hacia una recuperación total o hacia la completa inactivación dependiendo de las condiciones posteriores al tratamiento. El porcentaje de células dañadas depende de las condiciones de tratamiento, de las condiciones del medio y del propio microorganismo.

La naturaleza del mecanismo de inactivación de microorganismos por PEAI, generación de poros y la pérdida de componentes celulares al medio, entre ellos

material genético, y la recuperación de las células dañadas supone un riesgo que hay que evaluar si se quiere implantar a nivel industrial esta tecnología. Una de las estrategias para mantener la calidad de los alimentos procesados sin comprometer la seguridad microbiológica, es la tecnología de “barreras”. No obstante, es fundamental que la aplicación de una barrera no cree resistencias en el microorganismo frente a las siguientes barreras. Este estudio ha demostrado, por una parte, la existencia de una posibilidad, aunque remota y alejada de los tratamientos efectivos y óptimos de inactivación, de obtener células transformantes debido al tratamiento por PEAI (15 kV/cm y 700µs), dependiendo la generación de transformantes de la temperatura del producto, del tipo de microorganismo y del acondicionamiento previo de las células al tratamiento.

Para la implantación de una tecnología de conservación se hace indispensable un conocimiento profundo de los mecanismos de inactivación de las tecnologías de conservación. Los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad, además de generar poros en la membrana plasmática, afectan las proteínas-canal contenidas en la misma, afectando de este modo al balance químico de la célula. Es necesario completar los estudios realizados experimentalmente a nivel proteómico en cuanto al tratamiento de células de *E. coli* por esta tecnología, y ampliar conocimientos sobre posibles cambios de virulencia y resistencia del microorganismo tras el tratamiento.

IV.5.5 REFERENCIAS

Abee, T., and Wouters, J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. 1999. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 65-91.

Arsene, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 3-9.

Ananta, E., and Knorr, D. 2004. Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 96 (3): 307-313.

Aronsson, K. and Rönner, U. 2001 Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovation Food Science Emerging Technology*, 2, 105–112.

Aronsson, K., Borch, E., Stenlof, B., Rönner, U. 2004. Growth of pulsed electric field exposed *Escherichia coli* in relation to inactivation and environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 1-10.

Aronsson, K., Rönner, U., Borch, E. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *Int. J. Food Micro.* 99, 19-32.

Arroyo, C.; Somolinos, M.; Cebrian, G.; Condon, S.; Pagan, R. 2010. Pulsed electric fields cause sublethal injuries in the outer membrane of *Enterobacter sakazakii* facilitating the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 51(5), 525-531.

Barbosa-Cánovas, G.V., Gongora-Nieto, M., Pothakamury UR, Swanson, B.G. 1999. Preservation of Foods with pulsed electric fields, San Diego: Academic Press.

Bower, C.K., and Daeschel, M.A. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 50 (1-2): 33-44.

Bukau, B. 1993. Regulation of the *E. coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.* 9: 671-680.

Blomberg, A. 2002. Use of two-dimensional gels in yeast proteomics. *Methods Enzymol.* 350: 559-584.

Cheftel, J.C. 1995. Review: High pressure microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* 1: 75-90.

Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127.

Dutreux, N., Góngora-Nieto, M., Notermans, S., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. 2000a. Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 147-152.

Dutreux, N., Notermans, S., Witjes, T., Góngora-Nieto., M., Barbosa-Cánovas, G.V. y Swanson, B. 2000b. Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology* 54 91- 98.

García, D., Gómez, P., Condón, S., Raso, J., and Pagán, R. 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters Appl. Microbiol.* 36, 140-144.

García, D., Gómez, P., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., Pagán, R. 2005. Occurrence of sublethal injury alter pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium ph and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Micro.* 99, 94-104.

Gottesman ME, Hendrickson WA. 2000. Protein folding and unfolding by *Escherichia coli* chaperones and chaperonins. *Curr Opin Microbiol.* 3(2):197-202.

Hamilton, W.A., Sale, A.J.H. 1967. Effects of high electric fields on microorganism: II. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 148, 789-800.

Han, M.J., Lee, S.Y. 2006. The *Escherichia coli* proteome: Past, present and future. *Microbiology and molecular biology reviews.* 70, 2: 362-439.

Hülshager, H., Potel, J., Niemann, E.G. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environm. Biophys.* 20:53-65.

Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T., Sitzman, W. 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Tech.* 5:71-75.

Korolczuk, J., Ripoll McKeag, J., Carballeira Fernandez, J., Baron, F., Grosset, N. and Jeantet, R. 2006. Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation. *Journal Food Engineering*, 75, 11-20.

Krueger, J.H., and Walker, G.C. 1984. groEL and dnaK genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an htpR+-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(5):1499-503

Lado, B.H., Bomser, J.A., Dunne, C.P., Yousef, A.E. 2004. Pulsed electric field alters molecular chaperone expression and sensitizes *Listeria monocytogenes* to heat. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2289-2295.

Lebovka, N.L., Praporscica, I., Ghnimia, S., and Vorobieva, E. 2005. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *J. Food Eng.* 69 (2): 177-184.

Liang, Z.W., Cheng, Z., and Mittal, G.W. 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *J. Food Prot.*65: 1081-1087.

Mackey, B.M. 2000. Injured bacteria, in Lund B M, Baird-Parker T C and Gould G W, *The microbiological safety and quality of foods*, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, 315-341.

Martín-Belloso, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *J. Food Proc. Eng.* 20:317-336.

McIntyre, D.A., Harlander, S.K. 1989. Improved electroporation efficiency of intact *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* cells grown in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2621-2626.

Miller, J.F., Dower, W.J., and Tompkins, L.S. 1988. High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 85: 856-860.

Nover, L. 1991. HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. Stress Proteins and the Heat Shock Response. *New Biol.* 3 (9): 855-859.

Peleg, M., Cole, M.B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci.* 38:553-580.

Pérez-Arellano, I., Zúñiga, M. y Pérez-Martínez, G. (2001). Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid* 46 106-116.

Periago, P.M., Schaik, W., Abee, T., and Wouters, J.A. 2002. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 3486-3495.

Pina-Pérez M.C., Rodrigo D., Ferrer Bernat C., Rodrigo Enguídanos M., and Martínez-López A. 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal* 17, 1441-1449

Pina-Pérez M.C., Rodrigo D., and Martinez A. 2009. Sub-lethal damage in *Cronobacter sakazakii subsp. sakazakii* cells after different pulsed electric fields treatments in infant formula milk. *Food Control* 20, 1145-1150

Ravishankar, S., Fleischman, G.J., and Balasubramaniam, V.M. 2002. The inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiol.* 19: 351-361.

Rieder, K., and Lehner, A. 2007. Identification of proteins envolved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics.* 7: 1217-1231.

Russell, N.J. 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 27-34.

Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeast. *Biochim. Biophys Acta.* 148, 781-788.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sensoy, I., Zhang, Q.H., and Sastry, S.K. 1997. Inactivation kinetics of *Salmonella Dublin* by pulsed electric field. *J. Food Process Eng.* 20: 367-381.

Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., Mann, M. 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14440-14445.

Simpson, R.K., Whittington, R., Ernshaw, R.G., and Russell, N.J. 1999. Pulsed high electric field causes “all or nothing” membrane damage in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, but membrane H⁺-ATPase is not a primary target. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 1-10.

Solioz, M., Bienz, D. 1990. Bacterial genetics by electric shock. *Trends Biomed. Sci.* 15:175-177.

Solominos, M., García, D., Mañas, P., Condón, S., and Pagán, R. 2008. Effect of environmental factors and cell physiological state on Pulsed Electric Fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 124: 260-27.

Somolinos, M.; Espina, L.; Pagan, R.; Garcia, D. 2010. sigB absence decreased *Listeria monocytogenes EGD-e* heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. *International Journal of Food Microbiology.* 141(1--2), 32-38.

Tonella, L., C. Hoogland, P. A. Binz, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, and J. C. Sanchez. 2001. New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation. *Proteomics* 1:409–423.

Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J.G., Zhao, T., Tauxe, R.V. and Griffin, P.M. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: Insights into the infectious dose and method of wide spread contamination of hamburger patties. *Epidemiol. Infect.* 122, 185–92.

Ulmer, H.M., Heinz, V., Ganzle, M.G., Knorr, D., and Vogel, R.F. 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *J. Appl. Microbiol.* 93: 326-335.

Unal, R., Yousef, A.E., Dunne, P.C. 2002. Spectrophotometric assessment of bacterial cell membrane damage by pulsed electric field. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 3:247–254.

VanBogelen, R.A., Kelley, P.M., Neidhardt, F.C. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169 (1): 26-32.

Weibull, W. 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *J. Appl. Mech.* 51:293-297.

Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., de Leeuw, P.P., Hain, T., Chakraborty, T., Abee, T., 2004. Identification of sigma factor σ B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3457–3466.

Wouters, P.C., Smelt, J.P.P.M. 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: potential for food preservation. *Food Biotech.* 11:193-229.

Wouters, P.C., Bos, A.P., Ueckert, J. 2001. Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3092– 3101.

Wuytack, E.Y., Phuong, L.D.T, Aertsen, A., Reyns, K.M.F.A., Marquenie, D., Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A.M.J., and Michiels, C. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Protect.* 66: 31-37.

Yaqub, S., Anderson, J.G., MacGregor, S.J., Rowan, N.J. 2004. Use of a fluorescent viability stain to assess lethal and sublethal injury in food-borne bacteria exposed to high-intensity pulsed electric fields. *Lett. Appl. Micro.* 39:246–251.

Zimmermann, U. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology.* 105: 175–256.

DISCUSIÓN GENERAL

A partir del siglo XIX, debido a la revolución industrial y al aumento de la población, se produjo una migración de población del medio rural hacia las grandes ciudades. Esta migración supuso una revolución social a todos los niveles, imponiendo a las autoridades una necesidad de proveer de alimentos a este flujo migratorio. Como consecuencia, a mediados del siglo XIX empezó la comercialización de alimentos conservados térmicamente, permitiendo una vida útil suficiente a un precio asequible que pudo satisfacer las necesidades de alimentación que la sociedad demandaba.

Con las necesidades básicas de la población de alimentarse cubiertas, un incremento del poder adquisitivo de las sociedades occidentales, ha hecho que la sociedad demande alimentos de mejor calidad, tanto sensorial como nutritiva, que los medios de conservación de alimentos tradicionales no satisfacen plenamente. Estas nuevas demandas se han debido a la mayor concienciación de los consumidores por su salud, asociando la alimentación, junto con otros factores, con el bienestar físico y mental. Teniendo en cuenta que las tecnologías de conservación, principalmente las térmicas, empleadas mayoritariamente, son muy agresivas con el alimento, tanto desde el punto de vista sensorial como nutritivo, a partir de la última década del siglo XX, la reacción de la industria ha llevado dos caminos, no necesariamente excluyentes. Por una parte se ha ido desarrollando el enriquecimiento de alimentos con compuestos nutritivos necesarios para una dieta equilibrada, y por otra parte, se están desarrollando tecnologías de conservación menos agresivas, obteniendo de este modo alimentos lo más parecidos a los naturales. Mientras que la gama de alimentos fortificados como los compuestos nutritivos usados en la fortificación ha crecido rápidamente en la última década, el desarrollo de tecnologías de conservación menos agresivas ha evolucionado más lentamente.

Las líneas de investigación seguidas por la industria se centran en la optimización de los tratamientos térmicos, nuevos tipos de envasado, la adición de

compuestos antibacterianos y el desarrollo de tecnologías alternativas a la térmica. Esta mejora de la calidad manteniendo, por supuesto la seguridad microbiológica de los mismos, ha dado lugar al desarrollo de la “tecnología de barreras” (hurdle technology). El concepto consiste en la combinación de tecnologías de conservación nóveles y convencionales que establece una serie de factores de conservación (“barreras”) que los microorganismos no serían capaces de superar (**Leistner y Gorris, 1995**). Estas barreras podrían ser la temperatura, la actividad de agua, el pH, los conservantes, los antimicrobianos o las tecnologías no térmicas de conservación entre otras.

Entre las tecnologías no térmicas de conservación, los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad es una de las tecnologías que más intensamente se están investigando como alternativa al tratamiento térmico. Debido a la resistencia de las formas esporuladas de las bacterias y de los mohos a los PEAI, esta tecnología debe centrarse en los procesos de pasteurización, haciéndose necesario la refrigeración tras el tratamiento para retrasar o evitar el crecimiento de los microorganismos supervivientes.

Los trabajos que componen la presente tesis doctoral tratan de estudiar la idoneidad de la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad para tratar un alimento mezcla de zumo de naranja y leche estabilizado mediante la adición de pectina. La naturaleza de la sociedad actual ha conllevado una sustitución progresiva del consumo de fruta por zumos y derivados. Debido a que este tipo de alimentos son muy sensibles desde el punto de vista sensorial y nutricional a los tratamientos térmicos convencionales, los hace idóneos para la aplicación de tecnologías de conservación no térmicas ya que, como se ha comprobado ampliamente, preservan en mayor medida sus características de frescura. Para ello se han llevado a cabo estudios de inactivación por PEAI de microorganismos, tanto patógenos como alteradores, de destrucción de enzimas causantes de la pérdida de calidad del alimento y del efecto en nutrientes añadidos. Por último se llevaron a

cabo estudios de validación del efecto que produce esta tecnología en microorganismos comunes presentes en alimentos, con el objetivo de dilucidar su respuesta.

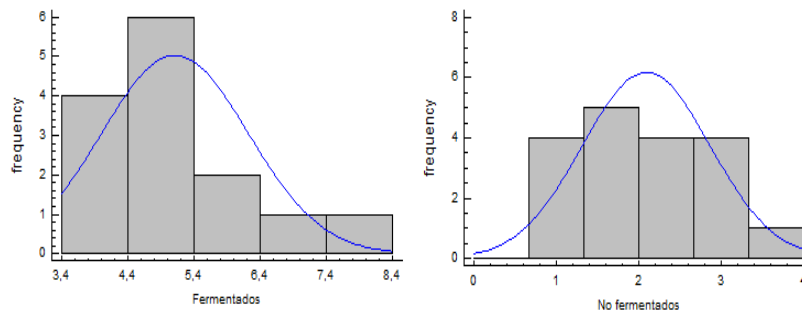


Figura V.1. Histograma de los valores de conductividad de los productos comerciales estudiados.

El primer paso de la presente tesis ha conllevado la caracterización físico-química de productos comerciales que contenían derivados lácteos y zumo de frutas para conocer el tipo de producto que se va a tratar, su problemática y posteriormente establecer las condiciones de tratamiento. En este sentido, se observó la existencia de dos tipos de productos, dependiendo del derivado lácteo usado, leche o leche fermentada. La elevada conductividad eléctrica y viscosidad de los productos que contenían leche fermentada, los hacía poco adecuados para ser tratados por PEAI. (Figura V.1). Para un mismo voltaje aplicado, cuanto mayor es la conductividad eléctrica del medio, menor es el campo eléctrico aplicado, siendo la efectividad del tratamiento menor. La manera de compensar la pérdida de efectividad sería incrementando el voltaje aplicado, con el consiguiente aumento de la probabilidad de ruptura dieléctrica.

Por otro lado, la caracterización físico-química de los productos comerciales proporcionó información sobre los componentes fundamentales (zumo de naranja, leche desnatada, agua, pectina de bajo metoxilo y azúcar) que debía tener el producto. La formulación final del producto (50 % de zumo de naranja) se basó

tanto en consideraciones tecnológicas como sensoriales, es decir, de las muestras ensayadas con mayor aceptación sensorial, se eligió aquella que el tratamiento fue más efectivo (mayor inactivación de *Escherichia coli*), resultando además un producto con una mayor concentración en zumo que las existentes en el mercado.

En general, la inactivación microbiológica alcanzada y su cinética de inactivación, debido a la aplicación de los PEAI depende de varios tipos de parámetros: 1) Parámetros del proceso y ambientales; 2) Parámetros microbiológicos; 3) Parámetros del producto. En la presente tesis se estudiaron para un mismo producto el efecto de los parámetros del proceso y ambientales (intensidad de campo, tiempo de tratamiento y temperatura) y de los parámetros microbiológicos (estudiando dos tipos de microorganismos, una bacteria y una levadura) en la inactivación microbiana. La gran mayoría de los estudios constatan que los factores principales que influyen en el proceso son la intensidad de campo eléctrico (E) y el tiempo de tratamiento (t).

El primer estudio del efecto de los PEAI en microorganismos que se llevó a cabo fue el efecto de la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento en la inactivación de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* suspendido en la bebida desarrollada. Para ambos microorganismos se constató que un incremento del valor de los parámetros de proceso (E y t) implica un incremento de la inactivación. Este hecho se ha observado en estudios de inactivación microbiana por PEAI tanto en medios de referencia como en alimentos. Tanto la resistencia a la acidez de ciertos microorganismos patógenos (*E. coli* y *Salmonella*) como su baja dosis de infección, ha obligado a la comunidad científica a considerar estos patógenos en alimentos que tradicionalmente se consideraban seguros. En las condiciones de tratamiento estudiadas ($E = 15\text{--}40$ kV/cm; $t = 0\text{--}700$ μ s) se alcanzó una inactivación máxima de *E. coli* de 3.83 ciclos logarítmicos. Junto con las bacterias lácticas, el *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos alteradores más importantes en zumo de naranja y derivados (Kimball 1999). La

bebida inoculada con la levadura fue tratada por PEAI ($E = 10 - 40$ kV/cm; $t = 0 - 1900$ μ s) a dos niveles de temperatura de entrada. Estudios paralelos de inactivación microbiana (*Salmonella typhimurium* y *Lactobacillus plantarum*) realizados en la misma bebida (Sampedro y col., 2011; Sampedro y col., 2007; Sampedro y col., 2006) obtuvieron inactivaciones máximas próximas a 2 ciclos logarítmicos para ambos microorganismos.

Se ha constatado en diversos estudios que las características físico-químicas del alimento ejercen una clara influencia en la inactivación microbiológica por PEAI (Martín y col., 1997; Grahl y col., 1996; Ho y col., 1995). En la figura VI.2, se compara las inactivaciones alcanzadas en zumo de naranja con las obtenidas en la bebida aquí estudiada. A pesar de no ser tratamientos iguales y las cepas de los microorganismos diferentes, se observa, principalmente en *E. coli*, una disminución de la inactivación conseguida en la bebida de zumo-leche, indicativo de una influencia de la composición del alimento en la inactivación. Sampedro y col. (2006) exponen, al comparar la inactivación de *L. plantarum* en agua peptonada, zumo de naranja-zanahoria y bebida zumo naranja-leche, la existencia de un efecto protector del medio frente a los PEAI. De igual modo, se observaba en el anejo 1 de la presente tesis, que el incremento de la proporción de zumo de naranja (sustituyendo al agua en la formulación) implicaba un descenso de la inactivación de *E. coli* en cualquiera de los tratamientos utilizados.

Un parámetro ambiental fundamental en la aplicación de los PEAI es la temperatura alcanzada durante el tratamiento. Dicha temperatura depende de la intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, la frecuencia, la conductividad eléctrica y la temperatura del alimento antes de someterse al tratamiento (temperatura inicial del alimento). Diversos estudios, han mostrado que la inactivación microbiológica y enzimática se ve influenciada por la temperatura, sin embargo pocos estudios han integrado este efecto en las cinéticas de inactivación (Sensoy y col., 1997; Fox y col., 2007). Un estudio comparativo del

efecto de la temperatura de entrada del alimento en las cinéticas de inactivación proporcionaría información fundamental a la industria en caso de variaciones de las condiciones de producción del alimento. Dos capítulos de la presente tesis han tratado de ampliar los conocimientos actuales del efecto de la temperatura del alimento en el tratamiento por PEAI, tomando como referencia un microorganismo alterador (*Saccharomyces cerevisiae*) y la enzima causante de la pérdida de calidad en este tipo de bebida (pectinmetilesterasa).

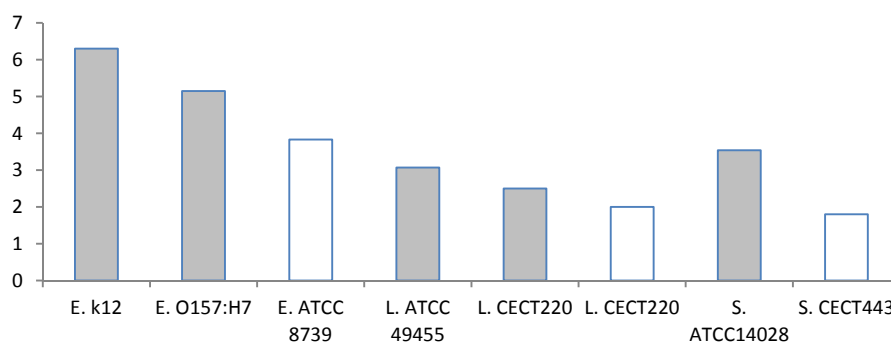


Figura V.2. Inactivaciones máximas de *E.coli*, *L. plantarum* y *S. typhimurium* en zumo de naranja (■) y bebida zumo naranja-leche (□).

Tabla V.1. Microorganismos, tratamientos y referencias bibliográficas usados en la figura V.2.

Microorganismo	Tratamiento	Referencia
<i>E. coli</i> k12	40 kV/cm; 100 μ s; 56°C	McNamen y col., 2010
<i>E. coli</i> O157:H7	35 kV/cm; 1700 μ s; 40°C	Mosqueda-Melgar y col., 2008
<i>E. coli</i> ATCC8739	15 kV/cm; 700 μ s; 55°C	Rivas y col., 2007
<i>L. plantarum</i> ATCC 49455	20 kV/cm; 70 μ s; 55°C	Gutler y col., 2010
<i>L. plantarum</i> CECT220	35,8 kV/cm; 46,3 μ s;	Rodrigo y col., 2001
<i>L. plantarum</i> CECT220	40 kV/cm; 130 μ s; 55°C	Sampedro y col., 2006
<i>S. typhimurium</i> ATCC14028	20 kV/cm; 70 μ s; 55°C	Gutler y col., 2010
<i>S. typhimurium</i> CECT443	40 kV/cm; 350 μ s; 5°C	Sampdro y col., 2011

En cuanto al efecto de la temperatura en la inactivación de *S. cerevisiae* se observa un efecto sinérgico entre la temperatura de entrada y los PEAI, siendo más evidente a tiempos cortos e intensidades de campo bajas. Este hecho se justifica al realizar el estudio desde el punto de vista de la energía consumida, donde se comprueba la existencia de un valor de energía a partir del cual no hay incremento de la inactivación al aumentar la temperatura de entrada.

Uno de los puntos débiles de la tecnología de PEAI es la escasa inactivación de enzimas, en el caso de la bebida desarrollada en la presente tesis, la pectínmetilesterasa. La combinación temperaturas suaves-PEAI se ha mostrado como una estrategia válida para aumentar la inactivación enzimática sin merma de la calidad del alimento (Yeom et al., 2000; Van Loey et al. 2002; Ho et al., 1997), por ello, también se estudió el efecto de los factores de proceso intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento y de la temperatura en la inactivación de la PME. La bebida fue tratada a tres niveles de temperatura de entrada (30, 35 y 40°C), obteniéndose una inactivación máxima de 95.8% (20 kV/cm, 800 μ s y 41 °C de temperatura de entrada). De igual modo que en los estudios del *E. coli* y del *S. cerevisiae*, al aumentar la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento, se incrementa la inactivación. Sin embargo, a diferencia del estudio de la levadura, el efecto sinérgico de la combinación temperatura-PEAI es mayor al aumentar la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento.

La microbiología predictiva puede definirse como una ciencia cuantitativa que evalúa objetivamente el efecto de las operaciones de procesado, distribución y almacenamiento sobre la seguridad microbiológica y calidad de los alimentos (McMeekin y col. 1993). Consiste en la predicción a través de modelos matemáticos, del comportamiento de microorganismos patógenos y alteradores alimentarios en respuesta a condiciones ambientales.

Los pasos a seguir en la modelización matemática se representan en la figura V.3.

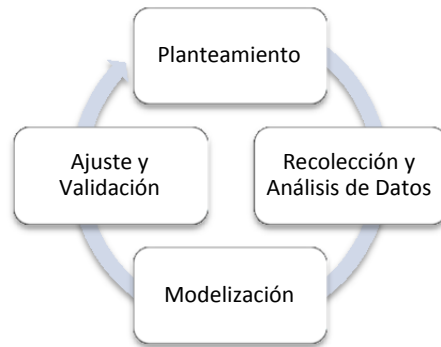


Figura V.3 Etapas genéricas para la realización de la modelización matemática.

Los modelos predictivos se pueden clasificar de acuerdo al esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1993):

1. Modelos primarios. Describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y cultivo.
2. Modelos secundarios. Están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de los modelos primarios con cambios en uno o más factores ambientales.
3. Modelos terciarios. Son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios, incorporados a programas informáticos de control a nivel de usuario, cuyo uso facilita la aplicación de dichas ecuaciones.

Los modelos predictivos se están aplicando en la actualidad en los sistemas de Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos (ARPC), en el desarrollo de nuevos productos, en el establecimiento de vida la comercial, y en la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (QMRA).

La modelización de las curvas de supervivencia es una herramienta esencial para garantizar la seguridad alimentaria de los alimentos procesados además de un paso intermedio en el análisis de riesgos. Se ha observado en numerosos estudios

que las curvas de supervivencia de microorganismos tratados por PEAI se alejan de la linealidad. Este comportamiento de las curvas de supervivencia podría ser debido a la existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana, donde la parte inicial de la curva, con una velocidad de inactivación más rápida, refleja la muerte de los microorganismos más sensibles, y la parte final de la curva, con una velocidad de inactivación más lenta, refleja la muerte de los microorganismos más resistentes. Sin embargo, Saldaña (2011) afirma que el alejamiento de las curvas de supervivencia de cinéticas de primer orden puede deberse también a una falta de homogeneidad del campo aplicado en la cámara tratamiento o bien a una adaptación del microorganismo al tratamiento.

Tabla V.2 Valores del factor de escala de Weibull de diferentes microorganismos tratados por PEAI en zumo de naranja-leche a 40kV/cm.

	S. cerevisiae	E. coli	L. plantarum	S. typhimurium
a (kV/cm)	0,00089	0,067	1,18	25,43
Referencias	Presente tesis	Presente tesis	Sampedro y col., 2006	Sampedro y col., 2011

En la presente tesis doctoral el ajuste de las curvas de supervivencia de *E. coli* y *S. cerevisiae* a modelos usados en estudios de PEAI (Bigelow, Hülshager y Weibull), mostró que el modelo de Weibull era el que mejor se ajustaba a los datos experimentales. En la figura V.4 se compara las curvas de inactivación predichas por el modelo de Weibull para una intensidad de campo eléctrico de 40 kV/cm, tanto de la presente tesis doctoral como de otros estudios realizados con el mismo equipo de tratamiento y en la misma bebida (Sampedro y col., 2006 y 2011). Se observa que las células de *L. plantarum*, *E. coli* y *S. cerevisiae* presentan una sensibilidad a los PEAI similar, siendo las células de *S. typhimurium* las menos sensibles al tratamiento, por lo tanto resultando ser el microorganismo más

resistente al tratamiento. Este hecho se observa al comparar los valores del factor de escala del modelo de Weibull para 40 kV/cm donde el valor más alto y por tanto, con una resistencia mayor al tratamiento corresponde al *S. typhimurium*.

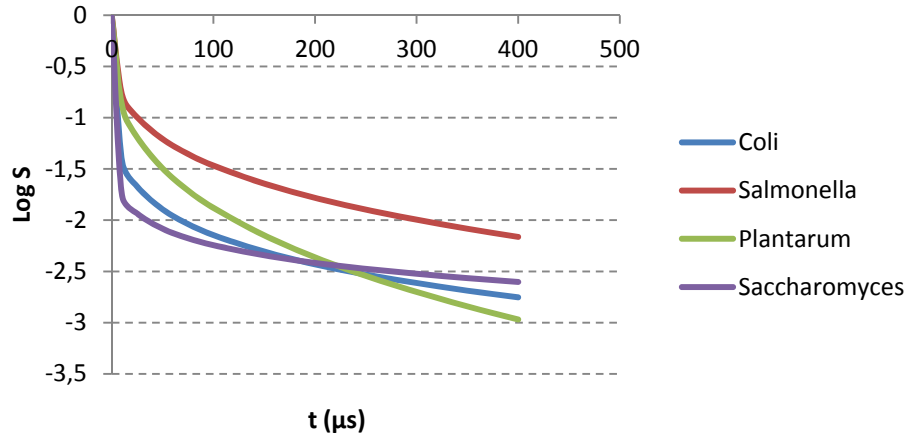


Figura V.4. Curvas de inactivación de 40 kV/cm predichas por el modelo de Weibull de *E. coli*, *S. typhimurium* (Sampedro y col. 2011), *L. plantarum* (Sampedro y col., 2006) y *S. cerevisiae*.

Un estudio más profundo permitió deducir que los valores del parámetro de escala eran dependientes del campo eléctrico aplicado, deduciéndose la relación existente que permitió por un lado la obtención de un modelo experimental simplificado que relacionó la inactivación conseguida con el campo eléctrico aplicado y el tiempo de tratamiento, y por otro el cálculo del parámetro secundario z_a , que a semejanza del parámetro z del tratamiento térmico, proporciona una herramienta útil para la búsqueda de microorganismos de referencia y para el diseño de tratamiento óptimos. En concreto, los valores de z de 43,1 kV/cm, 25,3 kV/cm y 14 kV/cm, para *E. coli*, *S. cerevisiae* y *S. typhimurium* (Sampedro y col., 2006) respectivamente, obtenidos a partir de los valores a de Weibull, muestran

que el valor de a de *E. coli* es el que menor sensibilidad presenta a la variación de la intensidad de campo eléctrico.

En el estudio de inactivación de la PME, las curvas de inactivación obtenidas también se alejan de la linealidad presentando hombros, es decir una mayor sensibilidad al tratamiento para tiempos largos. Ello ha sido atribuido por otros autores bien a la presencia de isoenzimas o fracciones con diferentes resistencias (Elez-Martínez y col. (2006), Clemente 1998 y 2002) o bien debido a la capacidad de extracción de la tecnología de enzimas presentes en los tejidos celulares. Las curvas se ajustaron a modelos (Log-logístico, Baranyi y Weibull) que se caracterizan por su flexibilidad para ajustarse a diferentes tipos de curvas. Se eligió el modelo Log-logístico por ser el que presentaba una coherencia entre los valores de los parámetros cinéticos y la intensidad de tratamiento aplicada (campo eléctrico y temperatura de entrada). Los parámetros que lo definen, b_1 y t_1 , son indicadores de la resistencia de la enzima dependiendo de la intensidad de campo eléctrico y temperatura de entrada. Esta dependencia permite el desarrollo de un modelo experimental, basado en el modelo Log-logístico, que relaciona la inactivación de la PME con la intensidad de campo, el tiempo de tratamiento y la temperatura de entrada.

El uso de tecnologías no térmicas de conservación está justificado porque conservan en mayor medida las propiedades nutricionales del alimento. En la presente tesis doctoral se llevaron a cabo dos estudios comparando el efecto de los PEAI y el tratamiento térmico convencional en la bebida fortificada con vitaminas hidrosolubles (biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina) y péptidos inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina I (IECA). En el estudio con las vitaminas hidrosolubles, los tratamientos por PEAI conservan mejor las vitaminas (biotina, folico y ácido pantoténico) que el tratamiento térmico intenso (95°C y 45 s). Tan importante como el efecto del tratamiento es la estabilidad de las muestras tratadas durante el almacenamiento (4°C), observándose que la

riboflavina, tras el tratamiento por PEAI se conservaba mejor tras 81 días que la tratada térmicamente. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Salvia-Trujillo y col. (2011) que, de igual modo que en la presente tesis, trataron por PEAI una bebida de zumo y leche y observaron una ausencia de variación en la concentración de vitaminas hidrosolubles del grupo B, tanto tras el tratamiento como durante el almacenamiento. Otros autores han estudiado el efecto de PEAI sobre el contenido de vitamina C, mostrando pérdidas inferiores al 10% tras el tratamiento por PEAI y siempre menores a las obtenidas tras tratamientos térmicos (Akin y Evrendilek, 2009; Elez-Martínez y Martín-Belloso, 2007; Plaza y col., 2006; Torregrosa y col., 2006a; Zulueta y col., 2010b; Walking-Ribeiro, M. y col., 2009). Respecto a los péptidos inhibidores de la ECA, no se encontraron diferencias en su estabilidad entre el tratamiento por PEAI y el térmico.

Uno de los aspectos de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad donde es necesario ampliar conocimientos es el efecto de esta tecnología en la seguridad alimentaria del alimento tratado, desde el punto de vista de posibles modificaciones en la resistencia al tratamiento de los microorganismos o en cambios de virulencia de microorganismos patógenos. Un aspecto importante y que es necesario tener en cuenta cuando se pretende introducir una nueva tecnología es la posibilidad de producir daño subletal. La recuperación de células dañadas bajo condiciones favorables es un hecho a tener en cuenta especialmente en la tecnología de los PEAI. El mecanismo de inactivación de microorganismos por PEAI es la generación de poros en la membrana plasmática, en tal número y tamaño que provocan la lisis de la célula. Si el poro se cierra antes de producirse la muerte de las células, éstas se recuperan. Cabe la posibilidad de que en el proceso se introduzca en las células material genético presente en el medio y ajeno a ellas, dando lugar a la formación de transformantes. Por tanto, debido a la similitud entre la electroporación y el proceso por PEAI, es necesario considerar la posibilidad de electro-transformación como consecuencia del tratamiento por PEAI. Para ampliar

conocimientos en estos campos se realizaron estudios de daño subletal y se investigó posibilidad de aparición de transformantes en suspensiones de *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei* tratados por PEAI. Ambos microorganismos se inocularon en medios de referencia para estudiar exclusivamente el efecto de la tecnología evitando así estreses debido a un alimento ácido como es la bebida de naranja y leche.

En cuanto a los resultados obtenidos, a pesar de que los tratamientos aplicados al *L. casei* provocaron la aparición de daño subletal en la población superviviente, las diferentes condiciones para la preparación de cultivos y suspensiones de células y tratamiento de células, no permitieron demostrar la existencia de electrotransformantes de *L. casei*.

En el caso del *E. coli* se estudió además el efecto de la variación de la temperatura de entrada del medio en la posibilidad de transformación y en la generación de daño subletal. En este caso sí que se observó electrotransformación, siendo además ésta dependiente de la temperatura del medio, incrementándose la frecuencia de transformación al aumentar la temperatura del mismo (de 7°C a 24°C). Debido al mecanismo de inactivación de los PEAI por generación de poros en la membrana, a priori, este incremento de la electrotransformación con la temperatura podría explicarse por el incremento del daño subletal que se observa en dicho rango de temperaturas. Sin embargo, mayores incrementos de temperatura (30°C), a pesar de obtenerse una mayor proporción de células dañadas, no generan electrotransformantes. La electrotransformación se produce porque se generan poros en la membrana, sin embargo, el daño subletal es consecuencia de diferentes efectos del estrés sobre la célula, siendo el efecto sobre la membrana plasmática uno de ellos. Sería necesario llevar a cabo estudios en mayor profundidad, pero en principio parece que la posibilidad de electrotransformación debido a los tratamientos por PEAI depende del microorganismo, de las condiciones de tratamiento y del medio donde se encuentre el microorganismo.

La respuesta de los microorganismos frente a la tecnología de los PEAI ha sido ampliamente estudiada tanto en alimentos como en medios de referencia, centrándose principalmente en estudios de inactivación, daño subletal y crecimiento tras el tratamiento. Sin embargo, hay un escaso conocimiento del tipo de modificaciones a nivel molecular que se producen al aplicar los PEAI a microorganismos. Es bien sabido que las células responden a condiciones estresantes del medio ambiente modificando su perfil proteico e induciendo la síntesis de proteínas específicas de respuestas al estrés. Este cambio en la expresión de proteínas puede conllevar un problema de seguridad alimentaria, si los microorganismos involucrados son patógenos, ya que puede haber una variación en la virulencia o en la resistencia a estreses de los mismos. Por tanto, es interesante el estudio de las variaciones que la tecnología de los PEAI pueda ejercer a nivel proteómico en microorganismos patógenos, como es el caso del *Escherichia coli*.

Los tratamientos realizados en el estudio de proteómica se eligieron por su capacidad para generar daño subletal y así poder relacionarlo con las posibles modificaciones causadas en el perfil proteico. De igual modo que en el trabajo de electrotransformantes, se estudió el efecto de la variación de la temperatura del medio y el tratamiento por PEAI en el perfil proteico de las células. De los resultados obtenidos, se observa que los tratamientos aplicados implican una modificación en el perfil proteico, generándose, por una parte, proteínas relacionadas con los mecanismos de recuperación celular y por otra, una destrucción parcial o total de proteínas situadas en la membrana, relacionadas con la transferencia de moléculas de la célula al medio.

La presente tesis ha mostrado que la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad puede ser una tecnología de conservación alternativa a la pasteurización térmica para tratar alimentos ácidos semejantes al estudiado, tanto desde un punto de vista microbiológico como de calidad y nutricional. De igual modo, el desarrollo de modelos predictivos experimentales que relacionen

parámetros de proceso y ambientales con inactivaciones, tanto microbiológicas como enzimáticas, es un paso clave para la optimización del procesado y una futura implantación del mismo. Finalmente, la presente tesis ha incidido en un aspecto fundamental, la evaluación de la tecnología desde el punto de vista de seguridad alimentaria, constatando la existencia de daño subletal, la modificación del perfil proteico de dichas células y la formación de células electrotransformadas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

1. El tratamiento por PEAI es efectivo frente a la inactivación de células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y la enzima pectinmetilesterasa en la bebida desarrollada, consiguiendo una mayor inactivación al aumentar el tiempo de tratamiento y la intensidad de campo eléctrico.
2. El tratamiento por PEAI presenta un efecto sinérgico con la temperatura de entrada del alimento en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* y la enzima pectinmetilesterasa. Por lo tanto, el incremento de la temperatura de entrada del alimento es una estrategia válida para aumentar la inactivación de la levadura y la enzima alcanzándose en el último caso inactivaciones semejantes a las obtenidas mediante tratamientos térmicos suaves (95,8 %).
3. La distribución de Weibull es el modelo matemático que mejor se ajusta a las curvas de supervivencia de *E. coli* y *S. cerevisiae* tratadas por PEAI. El factor de escala es el parámetro cinético, considerándose un indicador de la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento, tanto a la variación de la intensidad de campo eléctrico como de la temperatura de entrada del alimento.
4. Para ambos microorganismos se ha podido calcular el parámetro cinético secundario (z_a) resultando el obtenido para el *S. cerevisiae* más sensible que el obtenido para el *E. coli*.
5. El modelo Log-Logístico es el modelo matemático que mejor interpreta la inactivación de la PME.
6. Tanto en el caso de los microorganismos como de la enzima se ha podido obtener un modelo experimental que relacione la inactivación conseguida con la intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la

- temperatura de entrada siendo una herramienta que permite realizar predicciones en función de variaciones de las condiciones de tratamiento.
7. La tecnología de los PEAI es adecuada para preservar los péptidos inhibidores de la ECA adicionados a la bebida.
 8. Los PEAI conservan las vitaminas hidrosolubles (biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina) en igual medida que tratamiento térmicos suaves (84°C) y mejor que tratamientos térmicos intensos (95°C).
 9. La posibilidad de generación de transformantes debido al tratamiento por PEAI depende de las condiciones de tratamiento, del acondicionamiento previo de las células y del tipo de microorganismo.
 10. El tratamiento por PEAI modifica el perfil proteico del *E. coli* viéndose afectadas proteínas presentes en la membrana plasmática asociadas con el intercambio de moléculas entre el medio y la célula.
 11. La membrana plasmática de la célula se ve afectada por el tratamiento por PEAI, tanto en su componente lipídica (generándose poros que pueden producir una transformación de la bacteria) como en su componente proteica (destrucción de proteínas asociadas al intercambio de componentes).
 12. Mediante la tecnología de pulsos eléctricos de alta intensidad alta intensidad se puede conseguir la reducción, tanto de la carga microbiana capaz de crecer en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche como de la actividad enzimática de la pectínmetilesterasa. La aplicación de modelos matemáticos que relacionen las condiciones de tratamiento y las ambientales con la inactivación alcanzada es una herramienta fundamental tanto para garantizar la seguridad microbiológica como para la implantación de la tecnología a nivel industrial. Asimismo, para garantizar la seguridad de los productos tratados por PEAI es necesario profundizar en los estudios de validación.

ANEJOS

**ANEJO 1: Desarrollo de una bebida mezcla de
zumo de naranja y leche apta para el
tratamiento por Pulsos Eléctricos de Alta
Intensidad (PEAI).**

Estudio físico-químico de productos comerciales mezcla de zumo de frutas y derivados lácteos.

Para desarrollar una bebida mezcla de leche y zumo de naranja, en primer lugar se caracterizaron desde el punto de vista físico-químico (pH, conductividad, viscosidad y °Brix) muestras de alimentos comerciales que contuviesen en su formulación, entre otros componentes, derivados lácteos y zumo de frutas.

Los productos comerciales que se adquirieron se podrían dividir en dos grupos según el tipo de derivado lácteo: productos fermentados y productos sin fermentar. Los productos del primer grupo contenían en su formulación algún tipo de leche fermentada mientras los productos del segundo contienen leche no fermentada.

Tabla VII.1. Propiedades físico-químicas de los productos comerciales analizados en este estudio.

Tipo de producto	Nº de muestras	Propiedades Físico-químico	Valor	
			Inferior	Superior
Fermentado	14	pH	3,65	4,40
		Brix	7,8	21,2
		Conductividad (mS/cm)	3,67	7,42
		Viscosidad (mPa)	43	109
No fermentado	18	pH	2,65	4,13
		Brix	11,5	14,5
		Conductividad (mS/cm)	1,09	3,61
		Viscosidad (mPa)	21	34,5

En la Tabla VII.1 se muestra los valores de las características físico-químicas de los productos comerciales analizados. Mientras los valores de °Brix como del pH de los productos fermentados como no fermentados son semejantes, la viscosidad y la conductividad de los productos fermentados (3,67-7,42 mS/cm y

43-109 mPa, respectivamente) son muy superiores a la conductividad y la viscosidad de los no fermentados (1,09-3,61 mS/cm y 21-34,5 mPa, respectivamente).

Debido a los valores altos de viscosidad y conductividad de los productos que contienen leche fermentada, no se recomienda su uso para ser tratados por PEAI. Una viscosidad alta supondría una falta de uniformidad en la aplicación del campo eléctrico en el alimento en las cámaras de tratamiento además de una alta probabilidad de que se produzca fenómenos de ruptura dieléctrica. A su vez, como la conductividad eléctrica define la resistencia de las cámaras de tratamiento, una conductividad alta también incrementaría la energía aplicada y la temperatura de tratamiento, disminuyendo la efectividad del tratamiento.

Por lo tanto, centrándose en productos no fermentados, más del 90% de los productos comerciales utilizaban leche desnatada en su formulación, variando su contenido entre un 5 y un 20%, según lo declarado en la etiquetas. El uso de leche desnatada es preferible a la entera en bebidas que vayan a ser tratadas por PEAI ya que, la grasa que contiene la leche entera es un factor desfavorable para el tratamiento (Martín y col. 1996).

Respecto al zumo, existe una gran variedad de frutas usadas, variando entre un 2,5 y un 25%, según lo declarado en las etiquetas, siendo zumos de una fruta o combinación de varias. En todas las etiquetas viene reflejado que los zumo proceden de concentrados. Otros componentes minoritarios utilizados en las bebidas, son un acidulante (ácido cítrico), un estabilizante (pectinas) y azúcar.

Por lo tanto se decidió formular nuestra bebida con productos no fermentados, a base de leche desnatada y zumo de naranja, acompañados de ácido cítrico como acidulante y pectina de alto metoxilo como estabilizante.

Estudio de inactivación por PEAI de *E. coli* en las diferentes formulaciones.

A partir del estudio de mercado expuesto en el apartado anterior, se decidió realizar tres productos con las siguientes formulaciones:

Producto 1: 25% zumo; 20% leche desnatada; 55% agua destilada; 7,5% azúcar; 0,1% ác. Cítrico; 0,3% pectina alto metoxilo.

Producto 2: 50% zumo; 20% leche desnatada; 30% agua destilada; 7,5% azúcar; 0,1% ác. Cítrico; 0,3% pectina alto metoxilo.

Producto 3: 70% zumo; 20% leche desnatada; 10% agua destilada; 7,5% azúcar; 0,1% ác. Cítrico; 0,3% pectina alto metoxilo.

Estudios paralelos mostraron la estabilidad durante el almacenamiento bajo refrigeración de estas formulaciones.

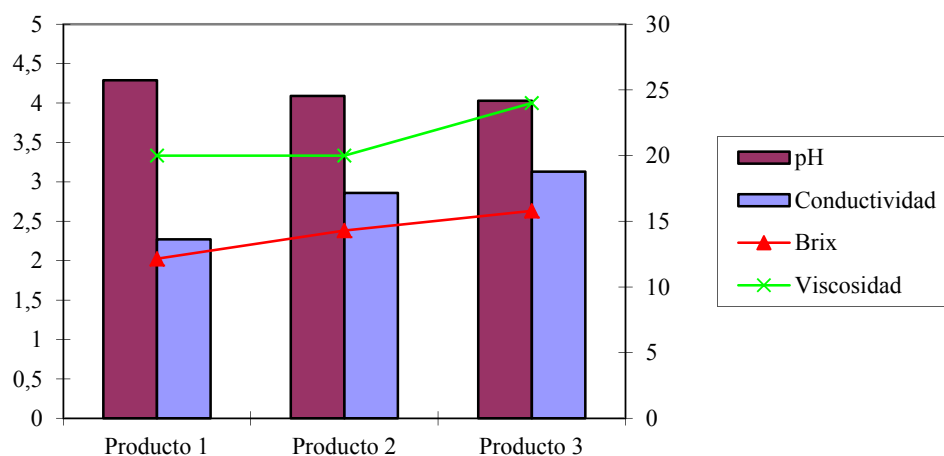


Figura VII.1.1 Valores de pH, °Brix, conductividad y viscosidad de los tres productos (25, 50 y 70% en zumo de naranja).

En la figura VII.1.1 se exponen los valores de pH, conductividad, viscosidad y °Brix de los tres productos. Como era de esperar, ya que se sustituye el agua por

zumo, un aumento del contenido en zumo implica un aumento de la conductividad, sólidos solubles, de la viscosidad y un descenso del pH.

Para el estudio de inactivación por PEAI de *E. coli* de los tres productos, éstos se sometieron a los siguientes tratamientos:

Intensidad de campo eléctrico:	40 kV/cm.
Tiempo de tratamiento:	30, 50, 70, 110 μ s.
Anchura del pulso:	2.5 μ s.
Temperatura de entrada:	35°C.
Temperatura máxima de tratamiento:	62°C.

En la figura VII.1.2 vienen representadas las inactivaciones de *E. coli* obtenidas en las condiciones de tratamiento estudiadas. Como se puede observar, al aumentar el tiempo de tratamiento se incrementa la inactivación ($p \leq 0.05$) en los tres productos.

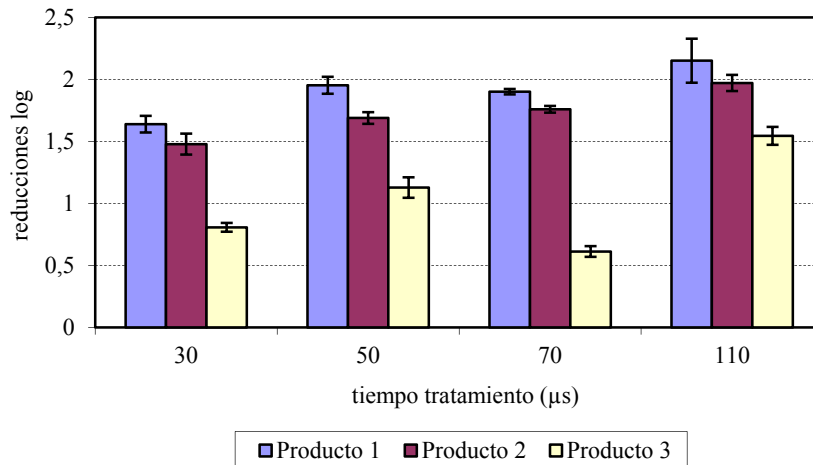


Figura VII.1.2. Inactivaciones de *E. coli* inoculado en los tres productos (25, 50 y 70% en zumo de naranja) en las condiciones de tratamiento estudiadas.

Cuando se comparan mismos tratamientos para los diferentes productos, se observa que al disminuir el contenido en zumo, aumenta la inactivación de *E. coli*

($p \leq 0.05$), siendo las diferencias en las inactivaciones en los productos 1 y 2 (25% y 50% de zumo, respectivamente) menores que respecto al producto 3 (70% de zumo).

La menor inactivación del producto 3 puede ser debido al incremento de la complejidad del producto (mayor contenido en zumo) que implica un aumento de la viscosidad y de la conductividad eléctrica. Mientras que las viscosidades de los productos 1 y 2 son similares, la del producto 3 es superior, observándose una tendencia de las viscosidades con la inactivación alcanzada en los tres productos. Como se ha comentado anteriormente, un aumento de la conductividad eléctrica implica una pérdida de la efectividad del tratamiento y un aumento de la temperatura del alimento sometido al mismo, tal y como se refleja en la gráfica VII.1.3, donde se observa temperaturas máximas alcanzadas inferiores en el producto 1 respecto a los otros productos. Otros estudios han relacionado la conductividad y la complejidad del sustrato con la inactivación microbiana mediante pulsos eléctricos de alta intensidad (Rodrigo et al., 2003; Martín et al., 1997).

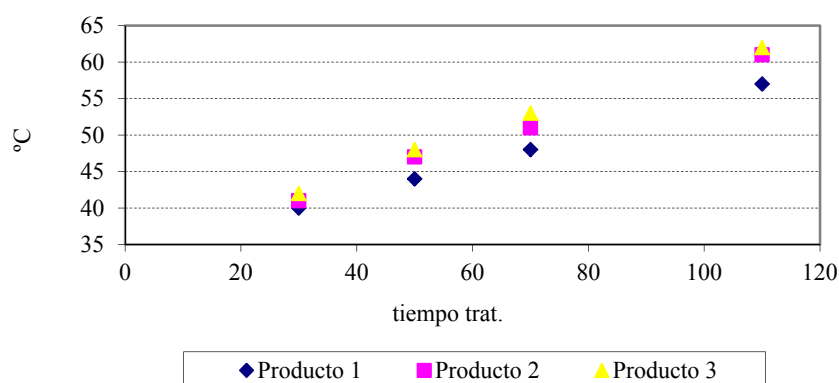


Figura VII.1.3 Evolución de las temperaturas máximas alcanzadas por los tres productos (25, 50 y 70% en zumo de naranja) en las condiciones de tratamiento estudiadas.

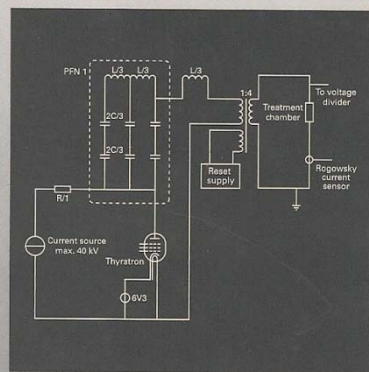
Elección de la formulación final de la bebida

Paralelamente a los estudios de inactivación por PEAI de *E. coli* en los tres productos, se realizaron análisis sensoriales de las distintas formulaciones, calificando el aspecto, sabor, viscosidad y preferencia global. Con respecto al parámetro “sabor”, los jueces prefirieron la formulación con un 50% de zumo de naranja, mientras que para el resto de parámetros no presentaron diferencias ($p > 0,05$) entre las formulaciones del 50 % y del 70 %.

Por lo tanto, aunque desde el punto de vista de la mayor inactivación alcanzada, la formulación con un 25 % sería la más adecuada para el tratamiento por pulsos eléctricos, ya que su menor complejidad favorece el tratamiento, se elige la formulación del 50 % en zumo debido a su mayor aceptación por los jueces, a la poca diferencia en nivel de inactivación respecto a la formulación del 25 % y al mayor contenido en zumo de naranja que los productos comerciales analizados hasta la fecha.

ANEJO 2: Publicaciones
asociadas a la presente tesis doctoral

WOODHEAD PUBLISHING IN FOOD SCIENCE, TECHNOLOGY AND NUTRITION



Food preservation by pulsed electric fields

From research to application

Edited by H. L. M. Lelieveld, S. Notermans and S. W. H. de Haan



WP

10

Adaptation potential of microorganisms treated by pulsed electric fields

D. Rodrigo, M. Zúñiga, A. Rivas and A. Martínez, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Spain, and S. Notermans, Foundation Food Micro and Innovation, The Netherlands

10.1 Introduction

The microbial ecology of foods is influenced dramatically by food processing and preservation techniques. Some of the processes used are traditional and are known to be effective in controlling any foodborne pathogens present. Control may be achieved by the effects of the product formulation, including the incorporation of preservatives, use of a decontamination treatment and other hygiene measures. Although vegetative bacteria may sometimes survive such conditions, they are often sub-lethally injured. In fact, almost all microorganisms of concern in the food industry are susceptible to stress and injury by chemical or physical treatments involved in food production. Sub-lethal injury was first demonstrated with lactic acid bacteria used as starter cultures in dairy fermentations. In this case, injury arose from exposure to chill conditions and the organisms were found to require additional nutrients to restore growth at the normal rate (IFT, 2002). The manifestations of injury can include more exacting growth requirements, an increased time lag prior to exponential growth, and greater sensitivity to inhibitory agents. On the other hand, there may be subsequent resistance to inactivation by agents that are normally inhibitory, a change in the virulence of a pathogen or acquisition of new characteristics (IFT, 2002). When only mild antimicrobial treatments are used in food processing, as in some newer techniques, the number of surviving organisms will be greater and sub-lethal injury will be less.

Whatever the proportion of injured cells, these can usually revert to the normal state by repairing the cellular damage under suitable conditions. Thus, the original capabilities of the cell will be regained following a period of recovery in the absence of inhibitory agents. In practice, however, the

A. Rivas · F. Sampedro · D. Rodrigo · A. Martínez ·
M. Rodrigo**Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended
in an orange juice and milk beverage**Received: 5 September 2005 / Revised: 12 December 2005 / Accepted: 19 December 2005 / Published online: 4 February 2006
© Springer-Verlag 2005

Abstract The killing effect of pulsed electric fields (PEF) on *Escherichia coli* (ATCC 8739) suspended in an orange juice and milk beverage was studied. Bipolar square pulses with a pulse width of 2.5 μ s were applied. Electric field strength and treatment times ranged from 15 to 40 kV/cm, and from 0 to 700 μ s, respectively. A maximum of 3.83 log reductions was achieved at 15 kV/cm and 700 μ s. The experimental data were fitted to Bigelow and Hülshöger models and Weibull distribution function. Results indicated that Weibull function best described the experimental data (lowest mean square error). As there were no significant differences in the values of the shape factor (n) at the electric field strength of 25–40 kV/cm, the number of parameters in the Weibull model were reduced, leading to a simplified model with a fit similar to that obtained with the full model.

Keywords Pulsed electric fields · Orange juice-milk · *Escherichia coli* · Inactivation kinetics

Introduction

Functional foods have been gaining in importance recent years because the consumer perceives them as healthy and beneficial for the health. The range of this sort of products increases daily, milk products mixed with juices and other minor components being the most popular. A major challenge in developing a functional beverage is to preserve its nutrients and make it attractive from a sensory viewpoint. Nowadays these types of beverages are treated thermally, which might involve the loss of important nutrient compounds and alteration of some of the natural characteristics of the food (flavour, colour, aroma, etc.) [1, 2]. Therefore the application of less aggressive technologies would be

desirable in order to preserve the nutritious and sensory properties of these beverages.

It has been proved in many foods that non-thermal technologies can produce enough reductions in the microbiological load to increase the shelf life of the products kept under refrigeration. Pulsed electric fields (PEF) is one of these non-thermal preservation technologies. This technology may be devised as an alternative or complement to heat pasteurization of liquid foods because it showed that it did not affect significantly the natural characteristics of the final product [3–6]. There are works that have studied pulsed electric fields microbial inactivation in orange juice and milk separately; however, no information has been published about the effectiveness of PEF treatment when microorganisms are contaminating a more complex product, such as a mixture of orange juice and milk.

Recent foodborne *E. coli* outbreaks involving apple cider, fresh apple juice and orange juice have highlighted the acid tolerance and probable low infective dose of this pathogen [7–12]. These findings strengthen the need to carry out extensive studies in order to check the nature of death of *E. coli* in an acid food pasteurized by using pulsed electric fields. Development of models to interpret the survival curves for *E. coli* in this type of food treated by PEF is essential.

Kinetic parameters and models are commonly used to develop food preservation processes to make the foodstuffs safe. Traditionally, first-order kinetic models have been used to describe the survival curves of microbial cells that receive thermal or non-thermal treatment [13–19]. However, there is significant evidence that microbial survival curves could not be log-linear. Alternative models and parameters for description of the survival of the microbial population when exposed to lethal agents should be recognized. One model that best describes non-logarithmic survival curves is the Weibull distribution [20–25].

The aim of this study was to investigate the PEF inactivation of *E. coli* suspended in an orange juice and milk beverage. The experimental inactivation data will be fitted

A. Rivas · F. Sampedro · D. Rodrigo · A. Martínez ·
M. Rodrigo (✉)
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C.,
P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain
e-mail: mrodrigo@iata.csic.es
Tel.: +34-96-390-00-22
Fax: +34-96-363-63-01



Effects of pulsed electric fields on water-soluble vitamins and ACE inhibitory peptides added to a mixed orange juice and milk beverage

A. Rivas^a, D. Rodrigo^{b,*}, B. Company^c, F. Sampedro^a, M. Rodrigo^a

^a Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Apartado postal 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^c Instituto Tecnológico Agroalimentario (AINIA), Benjamín Franklin 5-11, Parque Tecnológico de Valencia, 46980 Paterna, Valencia, Spain

Received 13 November 2006; received in revised form 3 January 2007; accepted 25 February 2007

Abstract

The effects of pulsed electric fields technology (15–40 kV/cm; 0–700 μ s) and thermal processing (84 °C and 95 °C, 15–120 s) were studied on an orange juice and milk mixed beverage fortified with water-soluble vitamins (biotin, folic acid, pantothenic acid and riboflavin) and angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. The evaluation of the technologies was carried out from two points of view: effect of treatments and effect of storage (4 °C, 81 days). The results confirmed the stability of the vitamins and the ACE inhibitory activity after the PEF treatment and during storage.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: ACE inhibitor peptides; Biotin; Folic acid; Orange juice–milk beverage; Pantothenic acid; Pasteurization; Pulsed electric fields; Riboflavin; Storage

1. Introduction

The increasing concern of consumers about their health and new lifestyles that are driving them away from healthy dietary habits has prompted the industry to become involved in the need for food products which contribute to the prevention of illness. The natural drinks (soy-based drinks or drinkable yogurts) that consumers consider healthy constitute one of the food industry sectors with highest growth worldwide (31% for soy-based drinks; and 19% for drinkable yogurts, in 2004) (Sloan, 2005). Reflecting a similar concern, as a result of the new Dietetic Guides for the Americans, published in 2005, the International Food Information Council has declared that now, and in the immediate future, food research and nutrition professionals must make the most of opportunities to develop

functional foods that support and promote health (Davis & Reinhardt, 2005).

Among the most consumed functional foods are mixed fruit juice and milk beverages fortified with vitamins, biologically active peptides, minerals and fibre (Pszczola, 2005). In Spain, consumption of enriched juices of this kind, in 2005, represented 19.47% of the total *per capita* consumption of juices (<http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/BD/resultado1.asp>). Recently, milk beverages fortified with bioactive peptides and minerals with antihypertensive properties have been commercialized (Sloan, 2005).

One of the nutritive compounds to take into account is the group of water-soluble vitamins. B group vitamins are water-soluble vitamins that have many different fundamental biological properties, such as protection against cancer, heart disease, and birth defects (Lucock, 2004). The stability of B vitamins depends on each vitamin and on external factors, such as presence of oxygen, light and acids. Another cause of vitamin B group losses is thermal treat-

* Corresponding author. Tel.: +34 963900022; fax: +34 963636301.
 E-mail address: lolesra@iata.csic.es (D. Rodrigo).

REFERENCIAS

Abram, F., Smelt J. P. P. M., Bos R. and Wouters, P. C. 2003 Modelling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment. *J. Appl. Microbiol.* 94, 571–579.

Akin, E.; Evrendilek, G. A. 2009. Effect of pulsed electric fields on physical, chemical, and microbiological properties of formulated carrot juice. *Food Sci. Tech. Int.*, 15(3), 275-282.

Álvarez, I., Raso, J., Palop, A., and Sala, F.J. 2000. Influence of factors on inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.*, 55: 143-146.

Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J., Condón, S. 2002. Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters Appl. Microbiol.*, 35: 489-493.

Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., & Raso, J. 2003 (a). The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 87-95.

Álvarez, I., Mañas, P., Condón, S., & Raso, J. 2003 (b). Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *Food Microbiology and Safety*, 68 (7), 2316-2320.

Álvarez, I.; Raso, J.; Sala, FJ; Condon, S. 2003(c). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiol.*, 20(6): 691-700.

Álvarez, I.; Virto, R.; Raso, J.; Condon, S. 2003(d). Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.*, 4(2): 195-202.

Álvarez, I., Condón, S., and Raso, J. 2006. Microbial inactivation by Pulsed Electric Fields. En J. Raso, V. Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry* (pp. 97-129). Springer: Nueva York.

Amiali, M., Ngadi, M.O., Raghavan, G.S.V., and Smith, J.P. 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid dialyzed egg using pulsed electric field. *J. Food Sci.*, 71:88-94.

Aronsson, K., & Ronner, U. 2001. Influence of pH, water, activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, 2(2), 105-112.

Arroyo, C.; Somolinos, M.; Cebrian, G.; Condon, S.; Pagan, R. 2010. Pulsed electric fields cause sublethal injuries in the outer membrane of *Enterobacter sakazakii* facilitating the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 51(5): 525-531.

Ayhan, Z.; Hye Won Yeom; Zhang, Q. H.; Min, D. B. 2001. Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. *J. Agricultural Food Chem.*, 49(2): 669-674.

Baranyi, J., Roberts, T. A., & McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43–59.

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 277–294.

Barbosa-Cánovas, G.V., Gongora-Nieto, M., Pothakamury UR, Swanson, B.G. 1999. *Preservation of Foods with pulsed electric fields*, San Diego: Academic Press.

Barbosa- Canovas, G. V., & Sepúlveda, D. 2005. Present Status and the Future of PEF Technology. In *Novel Food Processing Technologies*. Boca Raton: CRC Press.

Barsotti, L., and Cheftel, J.C. 1999. Food processing by pulsed electric fields. 2. Biological aspects. *Food Rev. Int.*, 15: 181-213.

Barsotti, L., Dumay, E., Mu, T. H., Fernández, M. D., & Cheftel, J. C. 2002. Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends Food Science and Technology*, 12, 136-144.

Bendicho, S.; Arantegui, J.; Martín, O. 2001. Processing of foods with high energy pulsed electric fields. II. Effects on microorganisms and components of the foods. *Alimentaria*, 323: 37-44.

Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2002(a). Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends Food Science and Technology*, 13(6/7),195-204.

Bendicho, S., Espachs, A., Arantegui, J., & Martín, O. 2002(b). Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research*, 69, 113-123.

Bouzzara, H; Vorobiev, E. 2000. Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. *International Sugar Journal*, 102 (1216): 194.

Bouzzara, H; Vorobiev, E. 2001. Non-thermal pressing and washing of fresh sugarbeet cossettes combined with a pulsed electrical field. *Zuckerindustrie*, 126 (6): 463-466.

Castro, A. J., Barbosa-Cánovas, G. V., and Swanson, B. G. 1993. Microbial inactivation of foods by pulsed electric field.. *Food Process. Preserv.* 17: 47-73.

Cebrián, G. 2009. *Mecanismos de inactivación y resistencia de Staphylococcus aureus a diferentes procesos de conservación de los alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.

Cebrian, G.; Sagarzazu, N.; Aertsen, A.; Pagan, R.; Condon, S.; Manas, P. 2009. Role of the alternative sigma factor sigmaB on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1): 187-196.

Chen Chen; Zhao Wei; Yang Rui-Jin. 2011. Effects of pulsed electric fields on quality and endogenous enzymes activity of freshly-squeezed carrot juice. *J. Beijing Technology and Business University*, 29(3): 28-32.

De Haan, S.W.H., and Willcock, P.R. 2002. Comparison of the energy performance of pulse generation circuits for PEF. *Innovative in Food Science and Emerging Technologies*, 3: 349-356.

Dunn, J. E. and Pearlman, J. S. (1987) Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. Maxwell Laboratories, Inc. U. S. Patent 4,695,472.

Dunne, C. P., Dunn, J., Clark, W., Ott, T., and Bushnell, A. H. 1996. Application of high energy electric field pulses to preservation of foods to combat rations. Science and Technology for Force XXI. Department of the Army. Norfolk, Virginia. June 24-27.7.

Elez-Martínez, P., Aguiló-Aguayo, I., Barbosa-Cánovas, G.V., and Martín-Belloso, O. 2003. Inactivation of proxidase in orange juice processed by high intensity pulsed electric fields. In *Proceedings Workshop on Nonthermal Food Preservation*, Wageningen, September 2003. Institute of Food Technologists (IFT).

Élez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. 2007. Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chem.*, 102, 201–209.

Elez-Martínez, P., Suárez-Recio, M., Espachs-barroso, A., Barbosa-Cánovas, G.V., and Martín-Belloso, O. 2003. High intensity pulsed electric field inactivation of pectin methyl esterase in orange juice. En *Proceedings of the 12th World Congress of Food Science and Technology*, Chicago (IL), U.S.A., July 2003. International Union of Food Science and Technology (IUFoST).

Elez-Martinez, P., Suarez-Recio, M., & Martin-Belloso, O. 2007. Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *J. Food Eng.*, 78 (1), 184-193.

Eshtiaghi, MN; Knorr, D. 2002. High electric field pulse pretreatment: potential for sugar beet processing. *J. Food Eng.*, 52 (3): 265-272.

Eshtiaghi, M.N. and Knorr, D. Process for treatment of sugar beet. European Patent No. EP 99923708. 1999. Filed June 9, 1999; approved March 3, 2001

Evrendilek, G. A., Jin, Z. T., Ruhlman, K. T., Qiu, X., Zhang, Q. H., & Richter, E. R. 2000. Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(1), 77-86.

Evrendilek, G.A.; Zhang, QH. 2003. Effects of pH, temperature, and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7. *J. Food Prot.*, 66 (5): 755-759.

Evrendilek, G.A., Li, S., Dantzer, W.R., and Zhang, Q.H. 2004. Pulsed Electric Field processing of beer: microbial, sensory and quality analyses. *J. Food Sci.*, 68(8): 228-232.

Fernandez-Diaz, MD; Barsotti, L; Dumay, E; Cheftel, JC. 2000. Effects of pulsed electric fields on ovalbumin solutions and dialyzed egg White. *J. Agricultural Food Chem.*, 48(6): 2332-2339.

Fox, M.B., Esveld, D.C., Mastwijk, H.C., and Boom, R. 2007. Inactivation of *L. plantarum* in a PEF microreactor. The effect of pulsed width and temperature on the inactivation. *Innovative Food Sci. & Emerging technol.*

García, D., Gómez, P., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., Pagán, R. 2005. Occurrence of sublethal injury alter pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium ph and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Micro.* 99, 94-104.

Gásková, D., Sigler, K., Janderová, B., and Plásek, J. 1996. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cell: factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 39: 195-202.

Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G.V., and Martín, O. 2001a. Effects of pulsed electric field processing on apple and pear polyphenoloxidases. *Food Sci. Tech. Int.*, 7(4): 339-345.

Giner, J., Gimeno, V., Ortega, M., Mesegué, M., Barbosa-Cánovas, G.V., and Martín, O. 2002. Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *J. Food Sci.*, 67(4): 1467-1472.

Giner, J.; Bailo, E.; Gimeno, V.; Martín-Belloso, O. 2005. Models in a Bayesian framework for inactivation of pectinesterase in a commercial enzyme formulation by pulsed electric fields. *Eur. Food Res. Tech.*, 221(3-4): 255-264.

Gomez, N; Garcia, D; Alvarez, I; Raso, J; Condon, RS. 2005(a). A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *J. Food Engineer.*, 70(1): 7-14.

Gomez, N; Garcia, D; Alvarez, I; Condon, S; Raso, J. 2005(b). Modelling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields in media of different pH. *Int. J. Food Microbiol.*, 103(2): 199-206.

Grahl, T., & Märkl, H. 1996. Killing of micro-organisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 148-157.

Gurtler, J.B., Rivera, R.B., Zhang, H.Q., and Gevecke, D.J. 2010. Selection of surrogate bacteria in place of *E. coli O157:H7* and *Salmonella Typhimurium* for pulsed electric field treatment of orange juice¹. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 1–8

Heesch, V.E.J.M., Pemen, A.J.M., Huijbrechts, P.A.H.J., van der Laan, P.C.T., Ptasinski, K.J., Zandstra, G.J., and De Jong, P. 2000. A fast pulsed power source applied to treatment of conducting liquids and air. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28: 137-143.

- Heinz, V., Phillips, S.T., Zenker, M., and Knorr, D. 1999. Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. *Food Biotech.*, 13: 155-168.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A., and Knorr, D. 2002. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends Food Sci. Tech.*, 12: 103-111.
- Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 167-175.
- Ho, S. Y., Mittal, G. S., Cross, J. D., & Griffiths, M. W. 1995. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science*, 60, 1337-1340.
- Hülshager, H., and Niemann, E. G. 1980. Lethal effects of high-voltage pulses on *E. Coli* K12. *Radiat. Environ. Biophys.*, 18: 281-288.
- Hülshager, H., Potel, J., & Niemann, E. G. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.*, 20, 53-65.
- Hülshager, H., Potel, J., and Niemann, E.G. 1983. Electric fields effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.*, 22: 149-162.
- Jacob, H.E., Förster, W., and Berg, H. 1981. Microbiological implications of electric field effects II. Inactivation of yeast cells and repair of their envelope. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 21: 225-233.
- Jaeger, H.; Schulz, A.; Karapetkov, N.; Knorr, D. 2010a. Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2): 154-161.
- Jaeger, H.; Meneses, N.; Moritz, J.; Knorr, D. 2010b. Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing. *J. Food Eng.*, 100(1): 109-118.

Jayaram, S., Castle, G. S. P. and Margaritis, A. 1992 Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnol Bioeng.* 40(11), 1412–1420.

Jayaram, S., Castle, G. S. P. and Margaritis, A. 1993. The effect of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 40: 117-122.

Jeantet, R., Baron, F., Nau, F., Roignant, M., and Brulé, G. 1999. High intensity pulsed electric field applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *J. Food Prot.*, 62(12): 1381-1386.

Jemai, AB; Vorobiev, E. 2002. Effect of moderate electric field pulses on the diffusion coefficient of soluble substances from apple slices. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 37 (1): 73-86.

Jemai, AB; Vorobiev, E. 2005. Pulsed electric field assisted pressing of sugar beet slices: towards a novel process of cold juice extraction. *Biosystems Engineering*, 93 (1): 57-68.

Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., Halley, R.A. 1999. Pulsed electric field processing of foods. *J. Food Prot.* 62: 1088-1096.

Kambiz Shamsi; Versteeg, C.; Sherkat, F.; Wan, J. 2008. Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.*, 9(2): 217-223.

Katsuki, S., Majima, T., Nagata, K., Lisitsyn, I., Akiyama, H., Furuta, M., Hayashi, T., Takahashi, K., and Wirkner, S. 2000. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* by pulsed electric field. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28: 155-160.

Katzin, LI; Sandholzer, LA; Strong, ME. 1943. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *J. Bacteriol.*, 45(3): 265-272.

- Ke-Fang Liu; Yun Li; Xing Yang; Xin-An Zeng; Yan-Yan Liu. 2009. Effect of high intensity pulsed electric fields on vitamin C content in orange juice. *Modern Food Sci. Tech.*, 25(7): 738-740.
- Kimball, D. A. (1999) Analysis of Citrus Microbiology. In Citrus Processing. A complete guide, pp.297–312. Gaithersburg, Maryland. Aspen Publishers.
- Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T., Sitzman, W. (1994). Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Tech.* 5:71-75.
- Lado, B.H., and Yousef, A.E. 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Appl. Environ. Microbiol.*,69: 2223-2229.
- Leistner, L. and Gorris, L.G.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Tech.*,6: 41-46.
- Lindgren, M. 2001. *Pulsed Electric Field food treatment and low frequency bioelectromagnetics*. Tesis doctoral. Chalmers University of Technology, Suecia.
- Lubicki, P., and Jayaram, S. 1997. High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *Bioelectrochem. Bioenergetics*, 43: 135-141.
- Mañas, P., Barsotti, L., Cheftel, J.C. 2001. Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters food constituents. *Inn. Food Sci. Emer. Tech.*, 2(4): 239-249.
- Marsellés-Fontanet, A.R., and Martín-Belloso, O. 2007. Optimization of PEF processing conditions to inactivate oxidative enzymes of grape juice. *J. Food Engineering*, 83: 452-462.
- Martín, O., Swanson, B. G., Chang, F. J., Qin, B. L., & Barbosa-Cánovas, G. V. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20, 317-336.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., and Ratkowsky, D.A. 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application. Wiley, New York.

McNamee, C., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J., and Scannell, A.G.M. 2010. PEF based hurdle strategy to control *Pichia fermentans*, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* k12 in orange juice. *International Journal of Food Microbiology* 138: 13–18

Meneses, N.; Jaeger, H.; Knorr, D. 2011. pH-changes during pulsed electric field treatments Numerical simulation and in situ impact on polyphenoloxidase inactivation. *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.*, 12(4): 499-504.

Min, S., Jin, Z. T., Yeom, H. W., Min, S. K., & Zhang, Q. H. 2003. Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice. *Food Chemistry Toxicology*, 68(4), 1265-1271.

Min, S., Min, S. K. and Zhang, Q. H. 2003 Inactivation kinetics of tomato juice lipoxygenase by pulsed electric fields. *Food Eng. Phy. Propert.*, 68(6), 1995–2001.

Mizuno, A., and Hori, Y. 1988. Destruction of living cells by high-voltage application. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 24: 387-394.

Morales de la Pena, M., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graue, M., and Martín-Belloso, O. 2010. Isoflavone profile of a high intensity pulsed electric field or thermally treated fruit juice-soymilk beverage stored under refrigeration. *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.*, 11(4): 604-610.

Morales de la Pena, M., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graue, M., and Martín-Belloso, O. 2011. Impact of high intensity pulsed electric fields or heat treatments on the fatty acid and mineral profiles of a fruit juice-soymilk beverage during storage. *Food control*, 22(12): 1975-1983.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 328–340.

Pagán, R., Esplugas, S., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1998. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Sci. Tech. Int.*, 4: 33-44.

Peleg, M. 1995. A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *J. Sci. Food Agricult.*, 67: 93-99.

Peleg, M. 1999. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*, 32, 271-278.

Pérez, O. E. and Pilosof, A. M. R. 2004. Pulsed electric fields effects on the molecular structure and gelation of β -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Res. Int.* 37, 102–110.

Periago Bayonas, Paula María. Modelos Predictivos de inactivación de *Bacillus Stearothermophilus* y evaluación de nuevas tecnologías para la obtención de datos cinéticos. Tesis Doctoral. Enero 1998. Universidad de Murcia.

Pina Pérez, M. C., Rodrigo, D., Ferrer, C., Rodrigo, M., Martínez, A. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by Pulsed Electric Field in Buffered Peptone Water and Infant Formula Milk. Accepted February 2007 International Dairy Journal.

Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D., and Martínez-López, A. 2009. Sublethal damage in *Cronobacter sakazakii* subsp. *Sakazakii* cells after different pulsed electric field treatments in infant formula milk. *Food Control*, 20: 1145-1150.

Plaza, L.; Sanchez-Moreno, C.; Elez-Martinez, P.; Ancos, B. de; Martin-Belloso, O.; Pilar-Cano, M. 2006. Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization. *Eur. Food Res. Tech.*, 223(4): 487-493.

Pothakamury, U.R., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 1996. Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *J. Food Prot.*, 59: 1167-1171.

Qin, B. L., Zhang, Q. H., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., and Pedrow, P. D. 1994. Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields with different voltage waveforms. *IEEE Trans Dielec Insul.* 1(6): 1047-1057.

Qin, B. L., Pothakamury, U. R., Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O. M., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. 1995. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technology*, 12, 55-60.

Rahn, O. 1929. The size of bacteria as the cause of the logarithmic order of death. *J. Gen. Physiol.*, 13(2): 179-205.

Rahn, O. 1945. *Injury and death of bacteria by chemical agents*. Biodynamica monographs, ed by B. J. Luyet. Normady, Mo 1945.

Raso, J., Calderón, M. L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. 1998. Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. *J. Food Sci.*, 63 (6), 1042-1044.

Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., & Sala Trepas, F. J. 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 21-29.

Riener, J.; Noci, F.; Cronin, D. A.; Morgan, D. J.; Lyng, J. G. 2009a. Effect of high intensity pulsed electric fields on enzymes and vitamins in bovine raw milk. *Int. J. Dairy Tech.*, 62(1): 1-6.

Riener, J.; Noci, F.; Cronin, D. A.; Morgan, D. J.; Lyng, J. G. 2009b. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on pectin methyl esterase inactivation in red grapefruit juice (*Citrus paradisi*). *Eur. Food Res. Tech.*, 228(3): 373-379.

Rodrigo, D., Martínez, A., Harte, F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Rodrigo, M. (2001). Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange-carrot juice by means of pulsed electric fields: Comparison of inactivation models. *Journal of Food Protection*, 64(2), 259-263.

Rodrigo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2003 (a)). Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1007-1012.

Rodrigo, D., Ruíz, P., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2003 (b)). Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 223-229.

Rodrigo, D., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2003c). Pectin Methyl Esterase and Natural Microbial Flora of Fresh Mixed Orange and Carrot Juice Treated with Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Protection*, 66, 2336-2342.

Rodríguez-Calleja, J.M., Cebrián, G., Condón, S., and Mañas, P. 2006. Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 903-912.

Roodenburg, B.; Morren, J.; Berg, H. E.; Haan, S. W. H. de. 2005a. Metal release in a stainless steel Pulsed Electric Field (PEF) system. Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method. *Innovative Food Sci. Emerg. Tech.*, 6: 327-336.

Roodenburg, B., Morren, J., Berg, H.E., Haan, S.W.H. de. 2005b. Metal release in a stainless steel pulsed electric field (PEF) system Part II. The treatment of orange juice; related to legislation and treatment chamber lifetime. *Innovative Food Sci. Emerg. Tech.*, 6: 337-345.

Saldana, G.; Puertolas, E.; Lopez, N.; Garcia, D.; Alvarez, I.; Raso, J. 2009. Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2): 160-165

Saldana, G.; Puertolas, E.; Condon, S.; Alvarez, I.; Raso, J. 2010. 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(2): 290-298.

Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeast. *Biochim. Biophys Acta*. 148, 781-788.

Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. (1968). Effects of high electric fields on microorganisms III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochimica et biophysica Acta*, 163: 37-43.

Salvia-Trujillo, L.; Morales-de la Pena, M.; Rojas-Grau, M. A.; Martín-Belloso, O. 2011. Microbial and enzymatic stability of fruit juice-milk beverages treated by high intensity pulsed electric fields or heat during refrigerated storage. *Food Control*, 22(10): 1639-1646.

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. 2006a. Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 30-34.

Sampedro, F.; Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martinez, A.; Rodrigo, M. 2007. Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk based beverage: Effect of process parameters. *J. Food Engineer.*, 80 (3): 931-938.

Sampedro, F.; Rodrigo, D.; Martinez, A. 2011. Modelling the effect of pH and pectin concentration on the PEF inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by using the Monte Carlo simulation. *Food Control* 22(3--4): 420-425.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2005a). Impact of high pressure and pulsed electric

fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53(11), 4403-09.

San Martin, M. F.; Sepulveda, D. R.; Altunakar, B.; Gongora-Nieto, M. M.; Swanson, B. G.; Barbosa-Canovas, G. V. 2007. Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Food Sci. Tech.*, 40(7): 1271-1279.

Schoenbach, K. H., Peterkin, F. E., Alden, R W., and Beebe, S. J. 1997. The effect of pulsed electric fields on biological cells: Experiments and applications. *IEEE Trans Plasma Sci.* 25(2): 284-292.

Sensoy, I., Zhang, Q.H. and Sastry, S. 1997. Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by Electric pulsed fields. *J.Food Proc. Eng.*, 20 (5): 367-381.

Sentandreu, E., Carbonell, L., Rodrigo, D., & Carbonell, J. V. 2006. Pulsed Electric Fields Versus Thermal Treatment: Equivalent Processes To Obtain Equally Acceptable Citrus Juices. *Journal of Food Protection*, 69(8), 2016–2018.

Sensoy, I., Zhang, Q. H., & Sastry, S. K. (1997). Inactivation kinetic of *Salmonella dublin* by pulsed electric fields. *Journal Food Process Engineering*, 20, 367–381.

Somolinos, M., García, D., Mañas, P., Condón, S., Pagán, R. 2008. Effect of environmental factors and cell physiological state on Pulsed electric Fileds resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 124: 260-267.

Somolinos, M.; Espina, L.; Pagan, R.; Garcia, D. 2010. sigB absence decreased *Listeria monocytogenes* EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1--2): 32-38.

Timmermans, R. A. H.; Mastwijk, H. C.; Knol, J. J.; Quataert, M. C. J.; Vervoort, L.; Plancken, I. van der; Hendrickx, M. E.; Matser, A. M. 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for

mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3): 235-243.

Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., and Knorr, D. 2006. Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing, *Food Reviews International*, 22:4, 405-423

Torregrosa, F., Esteve, M. J., Frígola, A., & Cortés, C. 2006 (a). Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange-carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. *Journal of Food Engineering*, 73, 339-245.

Torregrosa, F., Cortés, C., Esteve, M. J., & Frígola, A. 2006 (b). Effect of high-intensity pulsed electric fields processing and conventional heat treatment on orange-carrot juice carotenoids. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 9519-9525.

Van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 139–179.

Van Loey, A., Verachtert, B., & Hendrickx, M. E. 2002. Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends Food Science Technology*, 12, 94–102.

Vega-Mercado, H.; Powers, J.; Barbosa-Canovas, G. V.; Swanson, B. G.; Luedecke, L. 1995. Inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 using high voltage pulsed electric fields. *IFT Annual Meeting*.

Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O., Chang, F., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1996(a) Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields. *J. Food Process. Preserv.* 20(6), 501–510.

Vega-Mercado, H., Pothakamury, U.R., Chang, F., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1996(b). Inactivation of *Escherichia coli* combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Res. Int.*, 29: 117-121.ç

Walkling-Ribeiro, M.; Noci, F.; Riener, J.; Cronin, D. A.; Lyng, J. G.; Morgan, D. J. 2009. The impact of thermosonication and pulsed electric fields on *Staphylococcus aureus* inactivation and selected quality parameters in orange juice. *Food Bioprocess Tech.*, 2(4): 422-430.

Weibull, W. 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *J. Appl. Mech.*, 51, 293-297.

Wouters, P.C., Bos, A.P., Ueckert, J. 2001. Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3092– 3101.

Wouters, P. C., Dutreux, N., Smelt, J. P. P. M., & Lelieveld, H. L. M. 1999. Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5364-5371.

Wouters, P.C., Smelt, J.P.P.M. 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: potential for food preservation. *Food Biotech.* 11:193-229.

Xiong, R., Xie, G., Edmenson, A. S., Linton, R. S., & Sheard, M. A. A. (1999). Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology*, 16, 269–279.

Xiu-He Liu; Ying-Qiu Li; Wen Hua Bo; Wen Li Tian. 2010. Modelling the inactivation of PEF time and strength for soybean lipoxygenase in soymilk. *Agro Food Industry hi-tech.*, 21(3): 33-35.

Yang, R. J.; Li, S. Q.; Zhang, Q. H. 2004. Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *J. Food Sci.*, 69(4): FCT241-FCT248.

Yeom, H. W., Streaker, C. B., Zhang, Q. H., & Min D. B. 2000. Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4597-4605.

Yingqiu Li; Zhengxing Chen; Haizhen Mo. 2007. Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties of soybean protein isolates. *Food Sci. Tech.*, 40(7): 1167-1175.

Zhang, Q., Monsalve-González, A., Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 1994a. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in Apple juice by square-wave and exponential-decay pulsed electric fields. *J. Food Proc. Engineering*, 17: 469-478.

Zhang, Q., Monsalve-González, A., Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 1994b. Inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 37: 581-587.

Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 1995. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *J. Food Engineering*, 25: 261-282.

Zimmermann, U., Pilwat, G., and Rienmann, F. 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysics Journal*, 14: 881-889.

Zimmermann, U. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*. 105: 175–256.

Zulueta, A.; Barba, F. J.; Esteve, M. J.; Frigola, A. 2010a. Effects on the carotenoid pattern and vitamin A of a pulsed electric field-treated orange juice-milk beverage and behavior during storage. *Eur. Food Res. Tech.* 231(4): 525-534.

Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frigola, A. 2010b. Ascorbic acid in orange juice-milk beverage treated by high intensity pulsed electric fields and its stability during storage. *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.*, 11(1): 84-90.