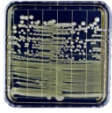
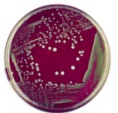


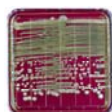
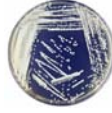
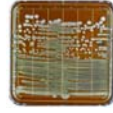


Tesis Doctoral

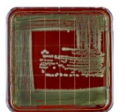
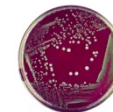
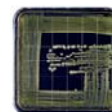
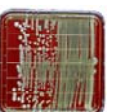
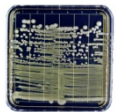
CRITERIOS DE PROCESADO PARA LA PASTEURIZACIÓN DE ALIMENTOS POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE



Guillermo Saldaña Navarro



Universidad
Zaragoza





**Universidad
Zaragoza**

Facultad de Veterinaria

Departamento de **P**roducción **A**nimal y **C**iencia de los **A**limentos

***Criterios de **P**rocesado
para la **P**asteurización de los **A**limentos
por **P**ulsos **E**léctricos de **A**lto **V**oltaje***

Memoria para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Zaragoza
presentada por:

GUILLERMO SALDAÑA NAVARRO

Directores:

Dr. Javier Raso Pueyo

Dr. Ignacio Álvarez Lanzarote



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Facultad de Veterinaria

Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos



D. Javier Raso Pueyo y D. Ignacio Álvarez Lanzasote, Profesores Titulares del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: *Criterios de Procesado para la Pasteurización de los Alimentos por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje*, de la que es autor D. *Guillermo Saldaña Navarro*, ha sido realizada bajo su dirección, su contenido se corresponde con el Proyecto de Tesis aprobado en su momento, y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 3 de Mayo de 2011

Fdo.: Dr. Javier Raso Pueyo

Fdo.: Dr. Ignacio Álvarez Lanzasote

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una Beca predoctoral concedida por el Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón (B045/08B), una Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2007-03828) y al proyecto NovelQ de la Comisión Europea FP6, 015710-2NOVELQ.

*A mis abuelos, Pilar, Artemio,
Pilar y, especialmente, José Luis.
Sé que nadie estaría más orgulloso
de mí, que tú.*

*“...llegar a la meta no es vencer; lo importante es el camino, y en él,
caer, levantarse, insistir, aprender.”*

Mago de Oz.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar mostrando mi gratitud a mis dos directores de tesis, el Dr. Javier Raso y el Dr. Ignacio Álvarez. Soy plenamente consciente que sin vuestra ayuda y paciencia, todo este trabajo no habría sido posible ni en forma ni en contenido. Por enseñarme a dar los pasos adecuados, gracias a los dos.

Por supuesto, muchas gracias al resto de profesores del Grupo de Nuevas Tecnologías de Conservación e Higienización de los Alimentos, especialmente al Dr. Santiago Condón, por darme la oportunidad de integrarme en la vida científica, desde aquella mañana que me pidió que me acercara a su despacho para ofrecerme lo que se culmina en este trabajo.

Al resto de compañeros del laboratorio, los que han pasado y los que aún quedan por aquí mientras escribo estas líneas, por escuchar y compartir los momentos más duros, así como las alegrías. María, Noelia S., Silvia, Elisa G., María Jesús, Elisa L., Laura, Abdenour, María H., Jorge, Luis, Tere, a la “jefa” Noe... y cómo no, a Guille, a quien tengo un gran respeto y admiración camuflados con momentos de bromas y risas, y a Cris, con quien empecé este largo camino, y con quien he compartido experiencias y sensaciones. Y también, gracias por empujarme a hacer el CAP contigo.

Gracias a los demás compañeros de pasillo, los de carne, Vero (cuántos años juntos), Mario, Elena, Laura, Sonia, los de leche, Edu, Indira, Mercedes, Ruth, María, y los de vegetales, Raúl, Jorge, Mariola, Anita, Leyre, Carolina, Sofía, Diego, por compartir ratillos de café, y ahorrarme unas cuantas horas de psicoterapia. Y a vosotros, compañeros de CTA, que empezasteis conmigo tantas cosas, y que vivisteis un gran momento de cambio en mi vida. A Marta, no te voy a decir nada que no te haya dicho, y agradecido, ya. A Guille, gran trabajador, persona, y tan majo que es imposible tenerte tirria. Y Bertus, de quien debo decir que no es solamente un compañero, sino un amigo de verdad, de los que cuentan contigo siempre. Entre el baloncesto y la ciencia, miles de gracias por todo lo que queda entre medio.

Thanks to Dr. Heinz and Dr. Töpfl to let me stay, work and learn in the DIL. Thanks too to all my friends there in Quakenbrück, or wherever you stay in the future. You made those days in Germany really good time, so really thank you Martina, Olli, Daniella, Berrit, and all the people in the office. And of course, Johanna (W), since that day when you invited me to go to the Flash.

Je voudrais remercier aussi les stagiaires de Quimper qui sont venus ici, et qui m'ont aidé pour mon travail. Spécialement, merci à Romain et Alia.

Aunque no formen parte de mi vida académica reciente, siempre han estado ahí, y tengo tanto o más que agradecer, a mis amigos de toda la vida. A Borja, Bea, Mario, Esther, Roque, Ana, Noe, Javi, Lorena, Edu, Fer, Ana, Violeta, Cherardo, Moni, Iñaki, Antonio...y Jesús, y Raúl. No sé si os merecéis aparecer aquí, por tantas veces que me habéis tocado las “morales”, por creer firmemente en mi título de “doctor con carita sonriente”, por identificar constantemente mis parecidos más razonables... Y a pesar de todo, os quiero como no os podéis imaginar, y sin vosotros todo esto hubiera sido todavía más difícil. Me alegráis la vida, y por eso, muchas gracias.

A mi familia, siempre me habéis apoyado incondicionalmente, y siempre habéis buscado lo mejor para mí. A todos mis tíos, especialmente a Miguel Ángel, Lola, Víctor y Pili, porque yo se que estáis orgullosos de mi como el que más, y a todos mis primos, porque siempre me preguntáis qué tal me va, y siempre dispuestos a escuchar el mismo rollo. A M^a Ángeles y José Manuel, Esti, Iñaki y Luna, porque también sois mi familia y siento cerca vuestro apoyo y ánimo.

A mi Papá y a mi Mamá, aunque suene cursi llamarlos así, no encuentro forma más cariñosa de nombrarlos. Para vosotros no encuentro palabras, desde bien chiquitín habéis luchado por mí, por darme lo mejor, y espero haber cumplido las expectativas, y seguir cumpliéndolas. No encuentro mejor manera de agradeceros absolutamente toda mi vida, que intentando haceros felices, a los dos.

Y a ti, Ricardo, compañero, amigo, tato. Por esas horas de estudio codo con codo. Por esos piques Ingeniero-Veterinario. Porque estoy orgulloso de ti, porque te admiro, y porque aunque no lo sepas, siempre me has ayudado a superarme. Y porque siempre hemos seguido las leyes de la... ¡termodinámica! Gracias también.

Y puestos a agradecer, a todos los profesores que me han traído hasta aquí desde el colegio y el instituto, especialmente a Mari Cruz, aunque no leas esto quizás nunca, siempre te recordare como la mejor profesora que he tenido.

Sin embargo, y con permiso de todos los anteriormente citados, hay dos personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento especialmente.

Al Dr. Puértolas, Edu. De ti he aprendido mucho, no solo del trabajo del laboratorio, también he crecido personalmente gracias en parte a las conversaciones que hemos compartido, tanto serias como distendidas. Como estas cosas son más fáciles de decir así, que en persona, que sepas que pocas personas gozan de la consideración que te tengo. Gracias por recordarme que la nave aguantará, que las cosas se hacen, o no se hacen, pero no se intentan, y siempre con fuerza y honor.

Y a ti, Henar, más agradecido a ti que a nadie en este mundo, nunca. Olvida esos momentos duros en los que has estado conmigo, de mi mano. Olvida cuando me has acompañado para ayudarme con mi trabajo. Olvida todas las veces que, con paciencia, me has enseñado el tuyo, y sí, he aprendido de ti. En definitiva, olvida las Tesis, la tuya y la mía, y aun así, me sobran motivos para estar tremendamente agradecido. Tú me aportas calma, equilibrio, y sobre todo y más que nada, me traes siempre esa *golosina demasiado fina para algún paladar*. Haz más esas otras palabras de *Queen*, y deja que pueda seguir agradeciéndote cada día de mi vida a tu lado.

RESUMEN

En la actualidad, el método más extendido para la pasteurización de los alimentos es el calor. Sin embargo, el calentamiento de los alimentos puede conllevar un deterioro de sus cualidades nutritivas y organolépticas. Por ello, en los últimos años, se están investigando sistemas alternativos como los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) debido a su capacidad para inactivar microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesado térmico. La implantación de tecnología de los PEAV en la industria para la pasteurización de los alimentos requiere demostrar no sólo que las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos no se ven afectadas por estos tratamientos, sino que los niveles de seguridad microbiológica que se obtienen son equivalentes a los alcanzados con el procesado térmico que pretenden sustituir.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue establecer criterios del proceso aplicables en un proceso industrial para la pasteurización de alimentos líquidos por medio de la tecnología de los PEAV.

Para alcanzar este objetivo general, se realizó un estudio inicial para identificar las cepas más resistentes a los tratamientos de PEAV entre cinco cepas de dos microorganismos patógenos Gram-positivos (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y dos microorganismos Gram-negativos (*Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*). Posteriormente, se obtuvieron datos cinéticos sobre la inactivación de las cepas más resistentes seleccionadas a distintas intensidades de campo eléctrico en el rango de pH de la mayoría de los alimentos. Los modelos matemáticos generados a partir de estos datos cinéticos permitieron demostrar que los niveles de inactivación obtenidos en las cepas más resistentes al tratamiento de PEAV, en condiciones de tratamiento aplicables en flujo continuo en un proceso industrial a temperatura ambiente, son insuficientes para garantizar la pasteurización de los alimentos. Estos

resultados indican la necesidad de combinar los PEAV con otros factores para conseguir un nivel de inactivación suficiente para conseguir este objetivo.

Con objeto de obtener una mejor comprensión de la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV, se diseñó y evaluó una cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos termostatados, con la que se comprobó que la inactivación microbiana por PEAV dependió de la temperatura de tratamiento incluso a temperaturas no letales para los microorganismos, por lo que la temperatura de tratamiento debe ser un factor considerado en la inactivación microbiana por PEAV. La presencia de nisina en el medio de tratamiento tuvo un efecto aditivo, o ligeramente sinérgico, en la inactivación por PEAV de las dos cepas Gram positivas, mientras que este antimicrobiano no incrementó la letalidad de los PEAV en las cepas Gram negativas. Sin embargo, la presencia del antimicrobiano N^o-lauroil etilester (etil lauroil arginato, LAE), aumentó la letalidad de los tratamientos de PEAV, tanto en las cepas de los microorganismos Gram positivos como las de los Gram negativos.

Los resultados obtenidos en una cámara de tratamiento estática se validaron en flujo continuo en zumo de manzana. Estos estudios demostraron que la combinación de los PEAV con temperaturas moderadas permitió definir criterios de procesado aplicables a escala industrial para conseguir reducir la población de las cuatro cepas más resistentes de cada una de las especies bacterianas patógenas, al menos 5 ciclos logarítmicos, en zumo de manzana. Este nivel de inactivación se consiguió con un tiempo de residencia de 0,8 segundos aplicando una intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm con una temperatura de entrada del producto en la cámara de tratamiento de 35°C y de salida de 60°C (110 kJ/kg) para las cepas de *Salmonella* Typhimurium 878, *L. monocytogenes* 5672 y *S. aureus* 4459. Para *E. coli* O157:H7 fue necesario una temperatura de salida de 65°C (125 kJ/kg). La presencia de LAE a una concentración de 50 ppm permitió reducir a 55°C (83.4 kJ/kg) la temperatura de salida para conseguir un nivel de inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en la población de las cuatro cepas más resistentes de cada una de especies bacterianas patógenas investigadas.

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje	3
1.1.1. Revisión Histórica	3
1.1.2. Mecanismo de acción de los PEAV	8
1.1.3. Aspectos técnicos de los PEAV	14
1.1.3.1. Parámetros de procesado	14
1.1.3.1.1. Intensidad del campo eléctrico	14
1.1.3.1.2. Forma del pulso	15
1.1.3.1.3. Tiempo del tratamiento	17
1.1.3.1.4. Frecuencia	17
1.1.3.1.5. Resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento	17
1.1.3.1.6. Energía del pulso	18
1.1.3.2. Principales componentes de un equipo de PEAV	20
1.1.3.2.1. Generador de PEAV	20
1.1.3.2.2. Cámara de tratamiento	22
1.1.3.2.2.1. Cámaras estáticas	24
1.1.3.2.2.1.1. Cámaras estáticas abiertas	24
1.1.3.2.2.1.2. Cámaras estáticas cerradas	25
1.1.3.2.2.2. Cámaras de flujo continuo	28
1.1.3.2.2.2.1. Cámaras de flujo continuo de electrodos paralelos	28
1.1.3.2.2.2.2. Cámaras de flujo continuo coaxiales	32
1.1.3.2.2.2.3. Cámaras de flujo continuo colineales	34
1.1.3.2.3. Sistema de control y toma de datos	41
1.1.4. Inactivación microbiana mediante PEAV	43
1.1.4.1. Factores que afectan a la inactivación microbiana	43
1.1.4.1.1. Factores del proceso	44
1.1.4.1.1.1. Intensidad del campo eléctrico	44
1.1.4.1.1.2. Forma y anchura del pulso, tiempo de tratamiento	45
1.1.4.1.1.3. Frecuencia	45
1.1.4.1.1.4. Energía específica	46
1.1.4.1.1.5. Temperatura	47
1.1.4.1.2. Características de los microorganismos	47
1.1.4.1.2.1. Tipo de microorganismo	48
1.1.4.1.2.2. Tamaño y forma de la célula	49
1.1.4.1.2.3. Fase de crecimiento y condiciones de cultivo	50
1.1.4.1.2.4. Condiciones de recuperación	50
1.1.4.1.3. Características del medio de tratamiento	51
1.1.4.1.3.1. Conductividad eléctrica	51
1.1.4.1.3.2. pH del medio de tratamiento	52
1.1.4.1.3.3. Actividad de agua	53
1.1.4.1.3.4. Composición del medio	53
1.1.4.2. Cinética de inactivación microbiana	55

1.1.4.2.1. Modelos primarios	56
1.1.4.2.2. Modelos secundarios	58
1.1.4.2.3. Modelos terciarios	60
1.1.4.3. Inactivación microbiana por PEAV en sistemas de flujo continuo	62
1.1.4.3.1. Campo eléctrico	68
1.1.4.3.2. Tiempo de tratamiento	69
1.1.4.3.3. Temperatura del tratamiento	70
1.1.4.3.4. Medio de tratamiento	72
1.1.4.3.5. Tipo de microorganismo	73
1.1.4.3.6. Cámara de tratamiento	74
1.1.4.3.7. Presencia de moléculas con efecto antimicrobiano	75
1.2. La Pasteurización	79
1.2.1. Nuevos conceptos de seguridad alimentaria: aplicación para la pasteurización de los alimentos	80
1.2.1.1. Objetivo de Seguridad Alimentaria	81
1.2.1.2. Criterios del Resultado	83
1.2.1.3. Criterios del proceso y del producto	86
1.2.2. Parámetros científicos requeridos para el establecimiento de métodos alternativos equivalentes de pasteurización	87
1.3. Microorganismos de interés en la pasteurización de los alimentos por PEAV.	93
1.3.1. Microorganismos Gram positivos	93
1.3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	94
1.3.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	97
1.3.2. Microorganismos Gram negativos	100
1.3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	100
1.3.2.2. <i>Salmonella</i> Typhimurium	105
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	111
3. MATERIAL Y MÉTODOS	117
3.1. Medios y Reactivos	119
3.2. Microorganismos	120
3.2.1. Obtención de las suspensiones	120
3.2.2. Curvas de Crecimiento	123
3.3. Tratamientos de PEAV	124
3.3.1. Generador de PEAV	124
3.3.1.1. Generador de pulsos eléctricos de caída exponencial	124
3.3.1.2. Generador de pulsos eléctricos de onda cuadrada	126
3.3.2. Cámaras de tratamiento	129
3.3.2.1. Cámaras de tratamiento estáticas	129

3.3.2.1.1. Sistema de medida de la temperatura durante los tratamientos de PEAV en estático	131
3.3.2.1.2. Evaluación del funcionamiento de la cámara de electrodos termostatados	132
3.3.2.2. Cámaras de tratamiento en flujo continuo	134
3.3.2.2.1. Configuración del equipo para el tratamiento en flujo continuo	139
3.3.3. Condiciones de tratamiento de PEAV	140
3.3.3.1. Tratamientos en condiciones estáticas	140
3.3.3.2. Tratamientos en condiciones de flujo continuo	141
3.4. Incubación y recuento de supervivientes	141
3.4.1. Recuento de supervivientes	141
3.4.2. Evaluación del daño subletal tras los tratamientos de PEAV	142
3.5. Tratamiento estadístico de los datos	144
3.5.1. Desarrollo de modelos matemáticos de inactivación microbiana por PEAV	144
3.5.2. Diseño experimental	146
3.5.3. Análisis estadístico	148
4. RESULTADOS	151
<i>Manuscrito I</i>	155
Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> in media of pH 4 and 7	
<i>Manuscrito II</i>	163
Modelling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella</i> Typhimurium in media of different pH	
<i>Manuscrito III</i>	175
Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> in media of different pH	
<i>Manuscrito IV</i>	187
Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions	
<i>Manuscrito V</i>	197
Combined effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> by pulsed electric fields	
<i>Manuscrito VI</i>	205
Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Escherichia coli</i> O157:H7 by pulsed electric fields	

<i>Manuscrito VII</i>	215
Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization	
<i>Manuscrito VIII</i>	229
Defining Treatment Conditions for PEF Pasteurization of Apple Juice	
5. DISCUSIÓN	243
5.1. Selección de cepas resistentes a los PEAV para establecer criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos	248
5.2. Modelización de la inactivación de las cepas resistentes a los PEAV para establecer los criterios de procesado necesarios para la pasteurización de los alimentos	252
5.3. Desarrollo de procesos combinados con los PEAV para establecer parámetros de procesado eficaces para la pasteurización de los alimentos	261
5.3.1. Influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV	262
5.3.2. Combinación de tratamientos de PEAV con antimicrobianos	266
5.4. Validación de criterios de procesado para la pasteurización de zumo de manzana por PEAV en tratamientos en flujo continuo	273
6. CONCLUSIONES	285
7. BIBLIOGRAFÍA	291

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1.	Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según los “modelos electromecánicos”.	11
1.2.	Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según las teorías de la formación de poros hidrofílicos.	12
1.3.	Tipos de pulsos monopolares más frecuentemente utilizados en los equipos de PEAV.	15
1.4.	Forma de los pulsos bipolares de caída exponencial y onda cuadrada.	16
1.5.	Esquema general de los principales componentes de un equipo de PEAV.	21
1.6.	Esquema de la cámara estática de configuración abierta diseñada por Sale y Hamilton (1967)	24
1.7.	Diseño original de cámara estática de configuración cerrada (Dunn y Pearlman, 1987).	25
1.8.	Esquema de la cámara de tratamiento de electrodos de plástico diseñada por Roodenburg <i>et al.</i> (2010)	27
1.9.	Diseño original de la cámara estática coaxial desarrollada por Matsumoto <i>et al.</i> (1991)	27
1.10.	Principales diseños de cámaras de tratamiento de flujo continuo.	28
1.11.	Diseño de la cámara de electrodos paralelos patentada por Dunn y Pearlman (1987)	29
1.12.	Esquema básico del diseño original de la cámara de electrodos paralelos de campo eléctrico convergente (Matsumoto <i>et al.</i> , 1991).	30
1.13.	Esquema de la cámara de electrodos paralelos de flujo continuo diseñada en la Universidad Técnica de Berlín.	31
1.14.	Esquema de la cámara de electrodos paralelos de borde concéntrico diseñada en el Instituto Alemán de Tecnología Alimentaria (DIL, Quakenbrück)	32
1.15.	Esquema de la cámara coaxial de flujo continuo diseñada por Qin <i>et al.</i> (1997)	33
1.16.	Modificación realizada por Qin <i>et al.</i> (2000) de la cámara de tratamiento coaxial diseñada por Qin <i>et al.</i> en 1997.	35
1.17.	Puntos propuestos para la caracterización de la intensidad del campo eléctrico en un tratamiento de PEAV mediante cámaras colineales.	37
1.18.	Esquema de la cámara de flujo continuo diseñada por Dun y Pearlman (1987) para la supresión del interruptor del circuito eléctrico.	39
1.19.	Configuración de cámaras colineales conectadas en serie patentada por Yin <i>et al.</i> (1997).	39
1.20.	Diseño general de la cámara de tratamiento de flujo continuo de Mastwijk y Bartels (2001).	40
1.21.	Esquema básico de la cámara colineal de flujo continuo desarrollada por Toepfl <i>et al.</i> (2007b)	40
1.22.	Ejemplo de gráfica de supervivencia cóncava obtenida en un tratamiento por PEAV.	56
1.23.	Casos hipotéticos de enfermedad causada por la presencia de un agente microbiano a diferentes concentraciones en el alimento, para ilustrar el cálculo de un criterio del resultado (ICMSF, 2002).	85

1.24. Estructura de las envolturas celulares de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (García, 2005c)	93
1.25. Posibles vías de transmisión de <i>E. coli</i> O157 (adaptada de Pennington, 2010).	104
1.26. Agentes causales de los brotes de origen alimentario en la U.E. en 2008 (EFSA, 2010).	108

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Esquema general para la obtención de suspensiones celulares.	121
3.2. Ejemplos de curvas de crecimiento de cada una de las especies microbianas utilizadas en esta Tesis Doctoral.	123
3.3. Configuración eléctrica del equipo de PEAV de caída exponencial.	126
3.4. Configuración eléctrica del equipo de PEAV de onda cuadrada.	127
3.5. Imágenes de la forma real de varios pulsos registrados por el osciloscopio conectado a la sonda de alto voltaje.	128
3.6. Esquema de la cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos.	130
3.7. Esquema de la cámara de tratamiento estática con electrodos paralelos termostatados.	131
3.8. Procedimiento para la medida de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de un tratamiento de PEAV.	132
3.9. Comparación de la evolución de la temperatura del medio de tratamiento en una cámara de tratamiento sin electrodos termostatados y con electrodos termostatados a distintas intensidades de campo eléctrico.	133
3.10. Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a temperaturas iniciales de 5°C, 15°C, 25°C, 35°C y 45°C utilizando la cámara de electrodos paralelos termostatada.	133
3.11. Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a 0.5 Hz, 1 Hz, 2 Hz y 3 Hz.	134
3.12. Esquema básico de la cámara de electrodos paralelos utilizada en esta Tesis Doctoral.	136
3.13. Simulación numérica de la distribución del campo eléctrico (kV/cm) en la cámara de tratamiento utilizada en esta investigación y estimación de la intensidad del campo eléctrico durante la aplicación de un pulso.	138
3.14. Esquema de la instalación para aplicar tratamientos de PEAV e flujo continuo.	139
3.15. Ejemplo de gráficas de supervivencia obtenidas mediante la recuperación de los microorganismos en un medio no selectivo y en medio selectivo.	142
3.16. Representación general de la combinación de factores estudiados en el diseño experimental de composición central.	147

5.DISCUSIÓN

5.1. Comparación de la resistencia a los PEAV de las cepas investigadas en medios de pH 4,0 y pH 7,0.	251
---	-----

5.2. Influencia de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo de tratamiento en la inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> 5672, <i>Salmonella</i> Typhimurium 878 y <i>S. aureus</i> 4459 tratados por PEAV en medio de pH 3,5.	256
5.3. Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la inactivación estimada para <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium 878, <i>L. monocytogenes</i> 5672 y <i>S. aureus</i> 4459 tras tratamientos de PEAV.	260
5.4. Esquema de la cámara de tratamiento estática con electrodos paralelos termostatados.	263
5.5. Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a temperaturas iniciales de 5°C, 15°C, 25°C, 35°C y 45°C utilizando la cámara de electrodos paralelos termostatada.	264
5.6. Representación de la temperatura estimada mediante simulación numérica dentro de la cámara de tratamiento con electrodos termostatados.	264
5.7. Gráficas de supervivencia correspondientes a la inactivación de <i>Salmonella</i> Typhimurium 878 por PEAV a diferentes temperaturas en tampón de pH 3,5.	265
5.8. Influencia de la temperatura y la presencia o ausencia de nisina en la inactivación estimada por los modelos matemáticos desarrollados para <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium 878, <i>L. monocytogenes</i> 5672 y <i>S. aureus</i> 4459 tras un tratamiento de PEAV en tampón de pH 7,0.	269
5.9. Influencia de la presencia de LAE en la inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 por PEAV a diferentes temperaturas.	272
5.10. Simulación numérica de la intensidad del campo eléctrico en el interior de la zona de tratamiento de una cámara de electrodos paralelos en flujo continuo y de una cámara colineal.	274
5.11. Influencia del campo eléctrico y la temperatura inicial en la inactivación por PEAV de <i>E. coli</i> O157:H7 en zumo de manzana estimada por la ecuación 5.10.	277
5.12. Influencia de la presencia de LAE en la inactivación por PEAV de <i>E. coli</i> O157:H7 suspendido en zumo de manzana estimadas por las ecuaciones 5.10 y 5.11 a diferentes temperaturas iniciales.	278
5.13. Estimación del tiempo de tratamiento y energía específica requeridos para alcanzar 5 ciclos logarítmicos de inactivación en una suspensión de <i>E. coli</i> O157:H7 suspendida en zumo de manzana con LAE a distintas intensidades de campo eléctrico y temperaturas iniciales.	279
5.14. Inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium 878, <i>L. monocytogenes</i> 5672 y <i>S. aureus</i> 4459 suspendidos en zumo de manzana y zumo de manzana con LAE tras aplicar tratamientos de PEAV a una temperatura inicial de 35°C y diferentes temperaturas finales.	281

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

- | | |
|--|-----|
| 1.1. Ecuaciones matemáticas utilizadas por diferentes autores para describir la cinética de inactivación microbiana mediante PEAV. | 59 |
| 1.2. Efecto de los PEAV en diversos microorganismos en diversos microorganismos en tratamientos en flujo continuo. | 63 |
| 1.3. Efecto de los PEAV en flujo continui en combinación con moléculas con efecto antimicrobiano. | 76 |
| 1.4. Signos y síntomas de la enfermedad relacionada con <i>E. coli</i> . | 102 |

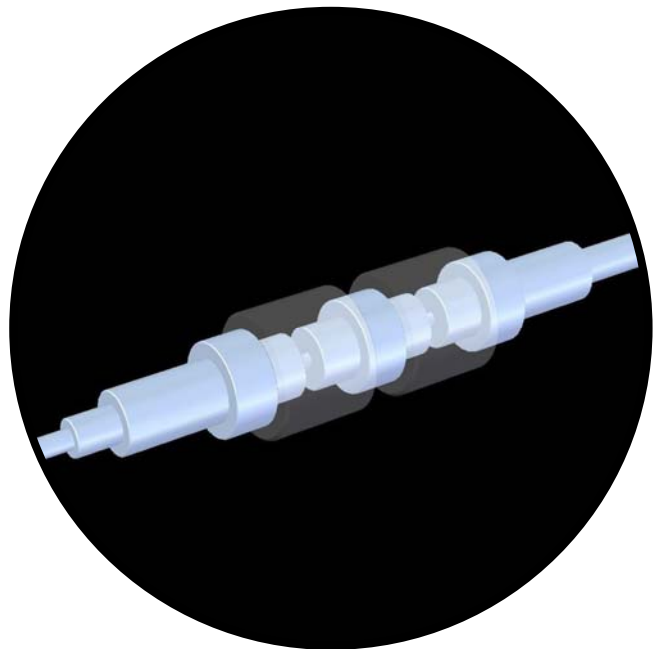
3.MATERIAL Y MÉTODOS

- | | |
|---|-----|
| 3.1. Medios, temperaturas y tiempos de cultivo de las distintas etapas de preparación de las suspensiones microbianas. | 122 |
| 3.2. Características principales de la cámara estática de electrodos paralelos utilizada en esta Tesis Doctoral. | 130 |
| 3.3. Características principales de la cámara de electrodos paralelos en flujo continuo utilizada en esta Tesis Doctoral. | 135 |
| 3.4. Ecuación de gobierno y condiciones de contorno utilizadas en la simulación numérica del campo eléctrico en el interior de la cámara de electrodos paralelos utilizados en esta Tesis Doctoral. | 137 |
| 3.5. Concentración máxima no inhibitoria de NaCl establecida para cada una de las cepas utilizadas en esta Tesis Doctoral. | 143 |

5.DISCUSIÓN

- | | |
|---|-----|
| 5.1. Definición de algunos conceptos de seguridad alimentaria | 253 |
| 5.2. Expresiones matemáticas para los parámetros de forma y escala de los modelos matemáticos basados en la distribución de Weibull, correspondientes a cada microorganismo estudiado. | 257 |
| 5.3. Modelos matemáticos desarrollados para estimar la inactivación en los microorganismos investigados tras los tratamientos de PEAV en función de la temperatura, el pH del medio y la presencia de nisina. | 268 |
| 5.4. Modelos matemáticos desarrollados para estimar la inactivación por PEAV de <i>E. coli</i> O157:H7 suspendido en zumo de manzana y zumo de manzana con 50 ppm de LAE a diferentes intensidades de campo eléctrico, temperaturas iniciales y tiempos de tratamiento. | 276 |

1. INTRODUCCIÓN



1.1. PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

El tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV, o PEF del inglés Pulsed Electric Fields) consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad y corta duración (μs) a un material colocado entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). Estos tratamientos provocan un fenómeno denominado electroporación, que consiste en la permeabilización transitoria o permanente de la membrana citoplasmática tanto de células eucariotas como procariotas. La electroporación de las membranas celulares de los tejidos animales o vegetales se está investigando con objeto de mejorar distintos procesos de la industria alimentaria, en los que se produce una transferencia de masa a través de estas membranas, como la extracción de distintos componentes intracelulares de interés, o la deshidratación (Knorr y Angersbach, 1998; Ade-Omowaye *et al.*, 2001; Vorobiev y Lebovka, 2006). Por otro lado, la permeabilización irreversible de las membranas de las células vegetativas de los microorganismos provoca su inactivación a temperaturas inferiores a las que se utilizan en el procesado térmico de los alimentos. Por ello, los PEAV son considerados, en la actualidad, como una de las tecnologías emergentes de conservación de los alimentos más prometedoras como alternativa a la pasteurización térmica de los alimentos.

1.1.1. Breve revisión histórica

Las primeras investigaciones sobre los efectos de la corriente eléctrica sobre las células datan de finales del siglo XIX. En 1890, Prochownik y Spaeth aplicaron una corriente continua de 300 mA a un gel de agar que contenía células de *Staphylococcus aureus* y observaron que, mientras que en el ánodo había células viables, en el cátodo todos los microorganismos se habían inactivado.

En la década de 1920, se introdujo un proceso llamado “Electropure” para la pasteurización de la leche mediante calentamiento óhmico (Beattie y Lewis, 1925; Fetterman, 1928; Moses, 1938). El producto era precalentado a 52°C y a continuación se hacía pasar a través de él una corriente eléctrica que aumentaba su temperatura hasta 71°C como consecuencia de la resistencia que ofrecía a su paso. A esta última temperatura el producto se mantenía durante 15 segundos. Esta técnica fue aceptada como un método de pasteurización de la leche en seis estados de EE.UU. Sin embargo,

su elevado coste energético y la aparición de otras técnicas de procesado de la leche, como el sistema UHT (del inglés, *Ultra High Temperature*), provocaron que en los años 50 este proceso se dejara de utilizar (Reitler, 1990).

En la década de 1950, se produjo otro avance en el uso de la electricidad como método de inactivación microbiana, al desarrollarse el denominado “tratamiento electrohidráulico” (Fruengel, 1960; Allen y Soike, 1966; Edebo y Selin, 1968). El proceso consistía en la descarga de corriente eléctrica de alto voltaje (hasta 15 kV) entre dos electrodos, sumergidos en un medio líquido a presión. Como consecuencia de la descarga, se generaban arcos eléctricos que producían ondas de presión de hasta 250 MPa y pulsos de luz ultravioleta. Con este método, Gilliland y Speck (1967) lograron inactivar hasta un 95% de la población de *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* y *Micrococcus radiodurans*. Sin embargo, la posible contaminación del alimento por radicales altamente reactivos generados por el deterioro de los electrodos, provocó que esa tecnología nunca se llegara a aplicar en la industria alimentaria (Jeyamkondan *et al.*, 1999).

Los primeros efectos de los pulsos eléctricos de alto voltaje sobre la viabilidad de los microorganismos fueron observados por Gossling (1960), cuando utilizó esta tecnología para inducir mutaciones en los microorganismos. Este investigador comprobó como la población de *Streptococcus lactis* se inactivaba en función de la intensidad de los tratamientos aplicados. Simultáneamente, el ingeniero alemán Heinz Doevenspeck (1960) describió en una patente las primeras aplicaciones prácticas de los pulsos eléctricos. En dicha patente se indicaba que los pulsos eléctricos se podían generar mediante la descarga repetida de la energía almacenada en un conjunto de condensadores, a través de un interruptor de alto voltaje y se proponían diferentes diseños tanto de cámaras de tratamiento estáticas como en flujo continuo. Las aplicaciones que se proponían para la tecnología iban desde la inactivación microbiana hasta la mejora de la extracción de componentes intracelulares contenidos en el interior de las células de tejidos animales.

La patente de Doevenspeck fue explotada por la empresa alemana Krupp Maschinentchnik, en 1985 mediante el desarrollo del proceso ELCRACK[®], que tenía como objetivo la desintegración celular en productos cárnicos y de la pesca para eliminar la grasa, y ELSTERIL[®], que tenía como objetivo la descontaminación de

alimentos líquidos (Sitzmann y Münch, 1988, 1989). Sin embargo, los altos costes energéticos del proceso y los incrementos de la temperatura que se producían en los productos tratados impidieron que estos procesos se generalizaran en la industria (Toepfl *et al.*, 2007a).

Los primeros estudios sistemáticos sobre el efecto letal de los PEAV sobre los microorganismos fueron realizados por los investigadores ingleses Sale y Hamilton (1967a,b), que trabajaban para la empresa Unilever. Éstos desarrollaron un generador de PEAV conectado a una cámara estática de tratamiento, con la cual investigaron la inactivación de *E. coli*, *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Candida utilis*. De sus estudios concluyeron que, en las células bacterianas expuestas a la acción de los campos eléctricos, se deterioraba la membrana celular, perdiéndose sus propiedades, y provocando su muerte. Como consecuencia del tratamiento, observaron que se producía la salida de iones, pérdida del contenido citoplasmático, cambios en la morfología de la membrana y lisis celular (Sale y Hamilton, 1968). Además, demostraron que la inactivación microbiana era independiente de la intensidad de corriente aplicada, por lo que la muerte de los microorganismos no era causada por efectos térmicos, y que los parámetros más importantes del proceso eran la intensidad del campo eléctrico y el número de pulsos aplicado.

Cuando los principios básicos y el potencial de los PEAV fueron más conocidos, otros investigadores empezaron a explorar los mecanismos de acción a nivel celular. Zimmerman *et al.*, (1974) introdujeron la teoría de la electroporación reversible, teoría que todavía sigue en uso para explicar el mecanismo de acción de los PEAV sobre las células. En la década de 1980, un grupo liderado por Hülshager, estudió la sensibilidad de diversos microorganismos a los PEAV y desarrollaron modelos matemáticos para describir la cinética de inactivación en función de la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento (Hülshager y Nieman, 1980; Hülshager *et al.*, 1983).

A finales de los años 1980, Dunn y Pearlman (1987), investigadores de Maxwell Laboratories, patentaron un proceso para la conservación de distintos alimentos líquidos mediante la aplicación de PEAV. Más tarde, en 1995, PurePulse Technologies, empresa subsidiaria de Maxwell Laboratories, comercializaron un proceso de PEAV en flujo continuo llamado CoolPure® para el tratamiento de líquidos y alimentos fluidos, capaz de procesar hasta 2000 L/h (Toepfl *et al.*, 2007a). Para las

investigaciones a escala de planta piloto, diseñaron un equipo más pequeño llamado CoolPure[®] Jr., que podía procesar caudales de 6 a 10 L/h a una intensidad de campo eléctrica máxima de 50 kV/cm (Toepfl *et al.*, 2007a).

Al comienzo de los años 1990 varios grupos de investigación, entre los que hay que destacar a los de los profesores Barbosa-Cánovas (*Universidad Estatal de Washington*) y Zhang (*Universidad Estatal de Ohio*) en EE.UU., y Knorr (*Universidad Técnica de Berlín*) en Europa, comenzaron a investigar las potenciales aplicaciones de los PEAV en la industria alimentaria. El creciente interés por esta tecnología condujo a la Unión Europea a financiar en 1997 el proyecto de investigación “High Electric Field Pulses: Food Safety, Quality and Critical Process Parameters” en el que participó nuestro grupo de investigación junto con otros laboratorios pertenecientes a otras universidades (*Universidad Técnica de Berlín, Universidad Católica de Lovaina, Universidad de Montpellier*), centros de investigación (*SIK, Ictetek*) y empresas (*TetraPak, Unilever, Bestfoods, Pernod Richard*). En la actualidad, alrededor de 25 grupos de investigación repartidos por todo el mundo están investigando aspectos básicos y aplicados sobre el uso de la tecnología de los PEAV en la industria alimentaria tanto para la conservación de los alimentos como para la mejora de fenómenos de transferencia de masa.

A principios del siglo XXI, diversas empresas e institutos de investigación como ScandiNova Systems (Upsala, Suecia), DIL (Instituto Alemán de Tecnología Alimentaria, Quakenbrück, Alemania), KIT (Instituto Tecnológico de Karlsruhe, Karlsruhe, Alemania) o la empresa Diversified Technologies (Bedford, EE.UU.) comenzaron a desarrollar y comercializar prototipos de equipos generadores de PEAV. Este aspecto ha resultado clave para la evaluación de las potenciales aplicaciones de la tecnología en la industria alimentaria. En 2005, apareció la primera aplicación comercial de un proceso de PEAV para la conservación de zumos de frutas en EE.UU. (Clarck, 2006). La empresa Genesis (Eugene, EE.UU.), que se dedicaba a la comercialización de zumos de frutas sin pasteurizar, decidió tratar sus zumos mediante PEAV para no tener que indicar en la etiqueta, según estipula la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (*Food and Drug Administration, FDA*), que el producto no ha sido pasteurizado y que puede contener bacterias patógenas responsables de enfermedades en niños, ancianos e individuos inmunodeprimidos (FDA, 2003). El equipo, diseñado por investigadores de Ohio State University y

comercializado por Diversified Technologies, que se utilizó para esta aplicación, era capaz de tratar hasta 200 L/h. Tras la aplicación del tratamiento de PEAV lograban obtener un producto cuya vida útil se extendía hasta cuatro semanas. Debido al gran impulso que esto supuso en el desarrollo industrial de la tecnología de los PEAV, las dos empresas implicadas, Genesis Juice Corp. y Diversified Technologies, fueron galardonadas en el año 2007 por el IFT (“Institute of Food Technologies”) con el “Food Technology Industrial Achievement Award”. Sin embargo, por diversos problemas de producción, Genesis Juice Corp. acabó cerrando a principios del año 2008. Tan sólo dos meses después, la empresa fue comprada por la corporación Toby’s Family Foods (Springfield, EE.UU.), y reabierta con un nuevo nombre (Genesis Organic Juice), volviendo a comercializar zumos, esta vez tratados por altas presiones hidrostáticas.

A pesar de la gran cantidad de grupos de investigación que están estudiando la tecnología de los PEAV y de los numerosos estudios realizados, en la actualidad, no existe ninguna aplicación industrial de esta tecnología para la pasteurización de los alimentos. Entre las causas que podrían explicar este hecho se pueden mencionar la dificultad de obtener conclusiones sólidas de los estudios realizados debido a las distintas condiciones experimentales utilizadas en distintos laboratorios, la falta de datos sobre las condiciones de procesado aplicables a escala industrial necesarias para inactivar a la flora patógena a niveles que garanticen la seguridad de los alimentos o la complejidad técnica que supone el desarrollo de equipos que permitan aplicar los tratamientos de PEAV requeridos a los flujos de tratamiento normalmente utilizados en la industria alimentaria.

1.1.2. Mecanismo de acción de los PEAV

Es conocido que, la acción de un campo eléctrico externo en forma de pulsos de corta duración, del orden de microsegundos, sobre células tanto procariotas como eucariotas, provoca un incremento en la permeabilidad de la membrana celular (Tsong, 1991). Este fenómeno, conocido como electroporación, es un proceso rutinario utilizado en biología molecular, para posibilitar el acceso al citoplasma con el fin de introducir diferentes moléculas. Más recientemente, se ha propuesto que el procesamiento mediante PEAV pueda resultar como un método efectivo para la inactivación de microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesamiento térmico, así como método para mejorar los procesos de transferencia de masa (Teissie *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en el proceso de electroporación siguen sin conocerse con absoluta precisión.

Según Saulis (2010), cuando se somete a una célula a la acción de un campo eléctrico externo, se produce una serie de modificaciones que se pueden dividir en cuatro etapas: (1) Un aumento del potencial transmembrana, (2) comienzo de la formación de los poros, (3) evolución en el número o el tamaño de los poros formados y, una vez que ya no existe influencia de un campo eléctrico externo, (4) recuperación de la integridad de la membrana celular, o bien, si se ha producido una electroporación irreversible, el intercambio de moléculas entre el medio extracelular y el interior de la célula.

1.- Aumento del potencial transmembrana:

La membrana citoplasmática se comporta como un condensador. En condiciones de reposo, se produce en la célula un acúmulo de componentes con cargas de distinto signo a ambos lados de la membrana, lo que provoca un potencial transmembrana de 10 mV aproximadamente. Ante la acción de un campo eléctrico externo, el potencial transmembrana aumenta paulatinamente hasta un valor máximo. Considerando que las células son esféricas, el valor del potencial transmembrana máximo $\Delta\Phi_g$ se puede calcular mediante la siguiente expresión (Saulis, 2010):

$$(Ec. 1.1) \quad \Delta\Phi_g = f_s E_0 a \cos \theta - \Delta\Phi_0$$

donde E_0 es el campo eléctrico externo, a es el radio de la célula, θ es el ángulo entre la superficie de la membrana y la dirección del campo eléctrico, $\Delta\Phi_0$ es el potencial transmembrana inicial y f_s es un factor propio de la célula que depende de la conductividad de la membrana, del medio intracelular y del extracelular y del grosor de la membrana (Saulis, 2010). El valor del potencial transmembrana generado por un campo eléctrico externo también puede ser calculado matemáticamente para otras formas celulares, como elipsoidales (Kinosita y Tsong, 1977a; Gimsa y Wachner, 2001), cilíndricas (Gimsa y Wachner, 2001) o irregulares (Pucihar *et al.*, 2006). Otros factores que tienen influencia en esta fase son parámetros del procesado (forma, duración y frecuencia de los pulsos), del medio de tratamiento (composición del medio, densidad de la suspensión celular, presión osmótica) y otras características de la célula (presencia de canales en la membrana).

2.- Formación de poros:

La permeabilización de la membrana se produce al superar un potencial transmembrana crítico (entre 0,2 y 1,0 V según la ecuación 2.1 o sus variantes). La proporción de poros formados en una célula depende principalmente del potencial transmembrana y, por tanto, de los factores que lo condicionan. Entre ellos, la intensidad del campo eléctrico aplicado parece ser uno de los de mayor influencia (Saulis, 2010). Otros factores que afectan a esta fase son la temperatura y la fluidez de la membrana.

Con objeto de explicar los mecanismos de iniciación del proceso de electroporación, han sido propuestas diversas teorías. Sale y Hamilton (1967b; 1968) fueron los primeros que señalaron la membrana citoplasmática como la estructura diana de los PEAV. A partir de esos primeros estudios, diversos modelos teórico-matemáticos surgieron con ánimo de explicar las bases biológicas de la electroporación. Estos pueden dividirse en dos grupos, los “modelos electromecánicos” (Neumann y Rosenheck, 1972; Crowley, 1973; Zimmermann *et al.*, 1974; Riemann *et al.*, 1975; Dimitrov, 1984) y los modelos basados en la formación de poros hidrofóbicos e hidrofílicos en la bicapa lipídica y/o en cambios de su fluidez (Abidor *et al.*, 1979; Powell y

Weaver, 1986; Glaser *et al.*, 1988; Barnett y Weaver, 1991; Saulis y Venslauskas, 1993a, 1993b; Joshi *et al.*, 2002).

Los “modelos electromecánicos” consideran que cuando la célula se expone a un campo eléctrico externo se produce una reorganización de las cargas, lo que provoca un aumento del potencial transmembrana, originando una deformación viscoelástica de la membrana como consecuencia de las fuerzas de atracción entre las cargas de signos opuestos. Si el campo eléctrico aplicado supera un determinado valor crítico, la atracción entre las cargas de ambos lados de la membrana citoplasmática produce fuerzas de electrocompresión suficientemente fuertes como para producir la ruptura dieléctrica de la membrana y el consecuente aumento de permeabilidad (Figura 1.1) (Neumann y Rosenheck, 1972; Zimmermann *et al.*, 1974). Estos modelos predicen la existencia de un campo eléctrico crítico por encima del cual la membrana es inestable (Crowley, 1973; Riemann *et al.*, 1975; Dimitrov, 1984). A pesar de su antigüedad, las “teorías electromecánicas” se siguen utilizando todavía en la actualidad para explicar el efecto de los campos eléctricos sobre las células debido a su sencillez matemática. Sin embargo, estos modelos no pueden explicar cuantitativamente la dependencia del voltaje transmembrana con la anchura del pulso aplicado, ni dilucidar estadísticamente por qué no todas las células de una misma población se electroporan a la vez (Kinosita y Tsong, 1977a, 1977b; Joersbo *et al.*, 1990; Saulis y Venslauskas, 1993b).

Intentando completar las lagunas de los “modelos electromecánicos”, surgieron otras teorías, con una mayor base matemática-estadística, que explican el incremento de permeabilidad de las células sometidas a la acción de un campo eléctrico, basado en la formación de poros hidrofílicos. Según estas teorías, en la membrana lipídica se forman de manera normal y espontánea poros hidrofóbicos de distinto radio (r_p), debido a fluctuaciones térmicas de las moléculas lipídicas. Por encima de un tamaño crítico (r_c), los poros se transforman en hidrofílicos, reduciéndose la energía del sistema y aumentando, por tanto, su estabilidad (Figura 1.2). La duración de los poros formados es a su vez variable y se relaciona con su tamaño y la energía del sistema.

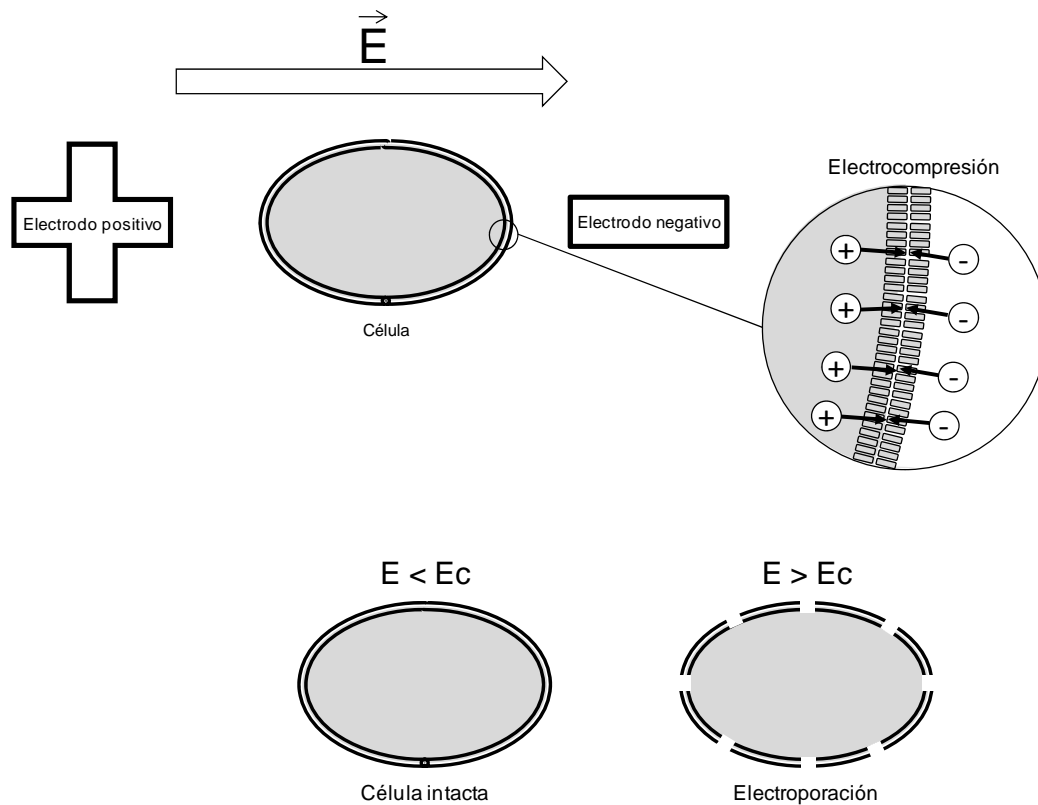


Figura 1.1. Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según los “modelos electromecánicos”. E es el campo eléctrico aplicado y E_c es el campo eléctrico crítico.

El aumento del potencial transmembrana y/o el calentamiento de los lípidos de la membrana por efecto Joule durante la aplicación de un tratamiento de PEAV provocan una disminución de la energía necesaria para la formación de los poros y, por lo tanto, aumenta en gran medida su número y tamaño. Además, disminuye también el radio a partir del cual los poros se transforman en hidrofílicos (r_c). Según estas teorías, la acumulación de poros hidrofílicos y su expansión son los causantes de la electroporación (Abidor *et al.*, 1979; Teissie y Tsong, 1981; Glaser *et al.*, 1988; Barnett y Weaver, 1991; Weaver y Chizmadzhev, 1996; Joshi *et al.*, 2002).

3.- Evolución del número y tamaño de los poros:

Para una adecuada eficiencia del procesamiento de los alimentos mediante PEAV, así como otras aplicaciones, el tamaño de los poros generados por la acción

del campo eléctrico externo es un aspecto importante. Mientras dura la acción del campo eléctrico, cambia el número y tamaño de los poros formados (Joshi *et al.*, 2004; Krassowska y Filev, 2007). Estudios teóricos muestran que un pulso de una duración del orden de nanosegundos podría crear poros de menor tamaño pero mayor cantidad, que un pulso de duración del orden de milisegundos (Gowrishankar *et al.*, 2006). Datos experimentales (He *et al.*, 2007) confirman las teorías de que al aumentar la amplitud y la duración de los pulsos, aumenta el número y el tamaño de los poros (Weaver y Barnett, 1992; Joshi *et al.*, 2004; Krassowska y Filev, 2007). Otro de los factores que puede influir en la evolución de los poros, así como en el número de poros formados como consecuencia del tratamiento de PEAV, es la temperatura del medio (Saulis, 2010).

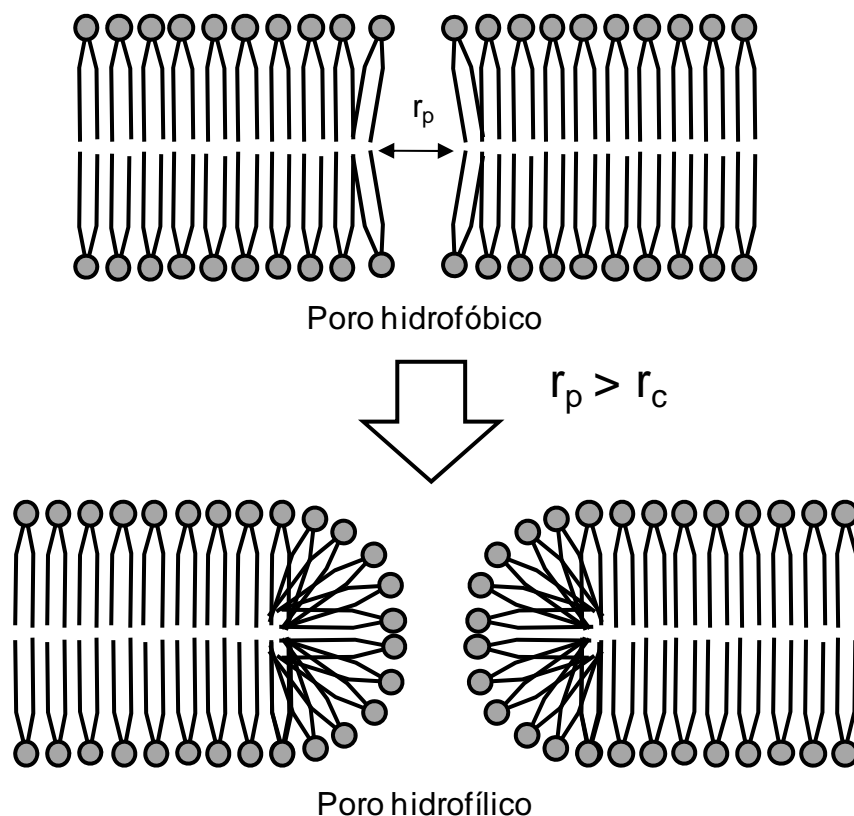


Figura 1.2. Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según las teorías de la formación de poros hidrofílicos. r_p es el radio de poro, r_c es el radio crítico.

4.- Cerrado de los poros:

El cierre de los poros sigue dos etapas, una rápida (de microsegundos a pocos minutos) en la que los poros reducen sensiblemente su tamaño, hasta alrededor de 0,5 nm, y una segunda etapa más lenta (de varios minutos a horas) en la que se completa el cerrado total de cada poro (Saulis *et al.*, 1991; Glaser *et al.*, 1988; Chernomordik *et al.*, 1987). La capacidad de las células de sellar los poros abiertos es lo que les permite mantener la actividad metabólica y sobrevivir al tratamiento (Kinosita y Tsong, 1977b; Saulis y Venslauskas, 1993a). En caso contrario, tiene lugar una electroporación irreversible, lo que puede conllevar la pérdida de componentes intracelulares, así como la entrada de otras moléculas al interior.

La reversibilidad o irreversibilidad de los poros depende de diversos factores como el grosor de la membrana, la forma y el tamaño de las células o la intensidad del campo eléctrico aplicado. De manera general, los poros formados serán reversibles si son pequeños en comparación con el área de la membrana. Un aumento de la intensidad del tratamiento, bien sea un incremento del campo eléctrico o del número o anchura de los pulsos, puede dar lugar a la irreversibilidad de los poros formados y a la consecuente muerte celular. En función del tamaño y la forma de la misma, el campo eléctrico crítico en el cual los poros formados pasan a ser irreversibles oscila entre 1 y 2 kV/cm para las células vegetales, y entre 10 y 14 kV/cm para los microorganismos (Toepfl *et al.*, 2005). Si bien los mecanismos reales y últimos que llevan a la muerte celular no se conocen con claridad, lo que parece un hecho es que deben estar relacionados con la formación de esos poros irreversibles (Pagán y Mañas, 2006).

1.1.3. Aspectos técnicos de los PEAV

1.1.3.1. Parámetros de procesado

Los principales parámetros de procesado que determinan la eficacia letal de los tratamientos de PEAV son la intensidad del campo eléctrico, la forma y la anchura del pulso, el tiempo de tratamiento, la frecuencia, la energía específica y la temperatura del medio de tratamiento. La intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la energía específica son los principales parámetros de control durante el proceso (Sale y Hamilton, 1967a; Wouters *et al.*, 2001a). Otros aspectos que es necesario considerar a la hora de aplicar los tratamientos en la práctica son el tipo de cámara utilizada, la distancia entre los electrodos, la resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento, que depende de la conductividad del medio de tratamiento, y en los procesos en flujo continuo, el tiempo de residencia, que depende del volumen de la cámara de tratamiento y del caudal utilizado (Wouters *et al.*, 2001a).

1.1.3.1.1. Intensidad del campo eléctrico

La intensidad del campo eléctrico (E) se define como la diferencia de potencial, aplicada entre dos electrodos donde se coloca el alimento, dividido por la distancia (d), existente entre ellos:

(Ec. 1.2)

$$E = \frac{V}{d}$$

Las unidades del campo eléctrico en el Sistema Internacional de Unidades (S.I.) son voltios dividido por metro (V/m); sin embargo, es más frecuente encontrarlo expresado en la literatura como kilovoltios dividido por centímetro (kV/cm).

Esta definición del campo eléctrico varía en función del tipo de cámara de tratamiento que se utiliza para aplicar el tratamiento. El cálculo del campo eléctrico en cámaras de electrodos paralelos se realiza a partir de la ecuación 1.2, en función de la diferencia de potencial entre los dos electrodos y la separación que hay entre ellos. Sin embargo, en cámaras colineales o coaxiales, en las que ambos electrodos no son paralelos, y por tanto, la distribución del campo eléctrico no es homogénea, el cálculo

de la intensidad del campo eléctrico es más complejo, como se comentará en el apartado dedicado a la configuración de las cámaras de tratamiento (1.1.3.2.2).

La distribución del campo eléctrico dentro de la cámara de tratamiento es otro factor que debe ser considerado. Una distribución heterogénea del campo eléctrico provoca que todas las partes del producto que se procesa no reciban el mismo tratamiento y puede conllevar la formación de pequeñas áreas en la zona de tratamiento donde la intensidad del campo es extremadamente elevada. En estas zonas, también denominadas “hot-spots”, se puede producir un aumento muy acusado de la temperatura del medio de tratamiento, y de la probabilidad de aparición de arcos eléctricos (Álvarez *et al.*, 2006). Este aspecto también se tratará con mayor profundidad en el apartado dedicado a la configuración de las cámaras de tratamiento (1.1.3.2.2).

1.1.3.1.2. Forma del pulso

Los dos tipos de pulsos eléctricos más habituales utilizados en el procesado de los alimentos por PEAV son los pulsos de caída exponencial y los pulsos de onda cuadrada (Figura 1.3). Los pulsos de caída exponencial se caracterizan por un rápido aumento de la diferencia de potencial hasta alcanzar un valor máximo y, posteriormente, ésta disminuye paulatinamente hasta alcanzar un valor igual a cero. Por el contrario, en los pulsos de onda cuadrada, tras el rápido incremento del voltaje, la diferencia de potencial se mantiene constante durante un periodo corto de tiempo (anchura de pulso), para volver a caer súbitamente, dando lugar a una onda cuadrada.

Desde un punto de vista práctico, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los pulsos de caída exponencial. En los pulsos de caída exponencial, una vez alcanzado el máximo voltaje, éste disminuye progresivamente a lo largo del tiempo, y parte de la energía utilizada se aplica a un voltaje que no tiene efecto letal. Se trata, por tanto, de una energía que únicamente contribuye al calentamiento del producto. En los pulsos de onda cuadrada, toda la energía utilizada se aplica al valor máximo de voltaje seleccionado (Zhang *et al.*, 1994b; Zhang *et al.*, 1995; Góngora-Nieto, 2001; Góngora-Nieto *et al.*, 2002a).

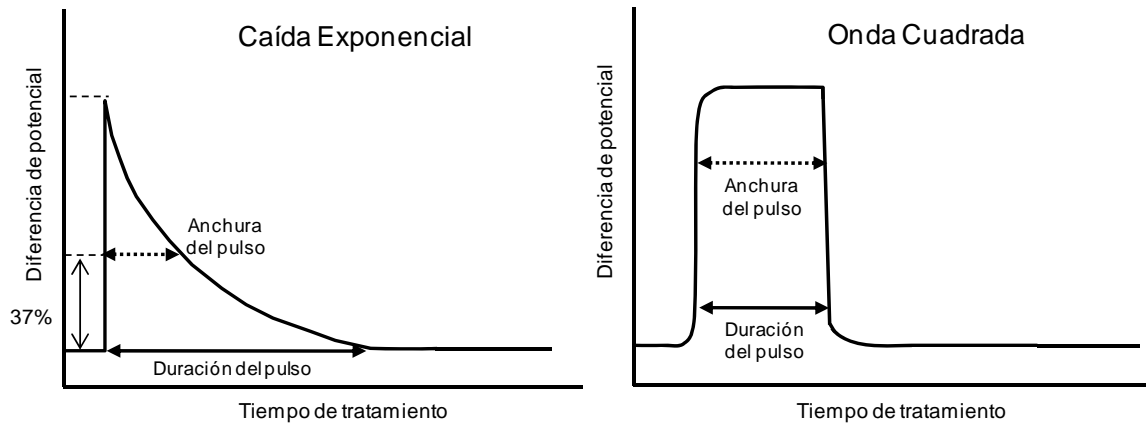


Figura 1.3. Tipos de pulsos monopolares utilizados más frecuentemente en los equipos de PEAV.

Tanto los pulsos de onda cuadrada como los de caída exponencial pueden ser monopolares o bipolares. Los pulsos bipolares se caracterizan porque tras la aplicación de un pulso de una polaridad le sigue otro de igual amplitud y polaridad inversa (Figura 1.4).

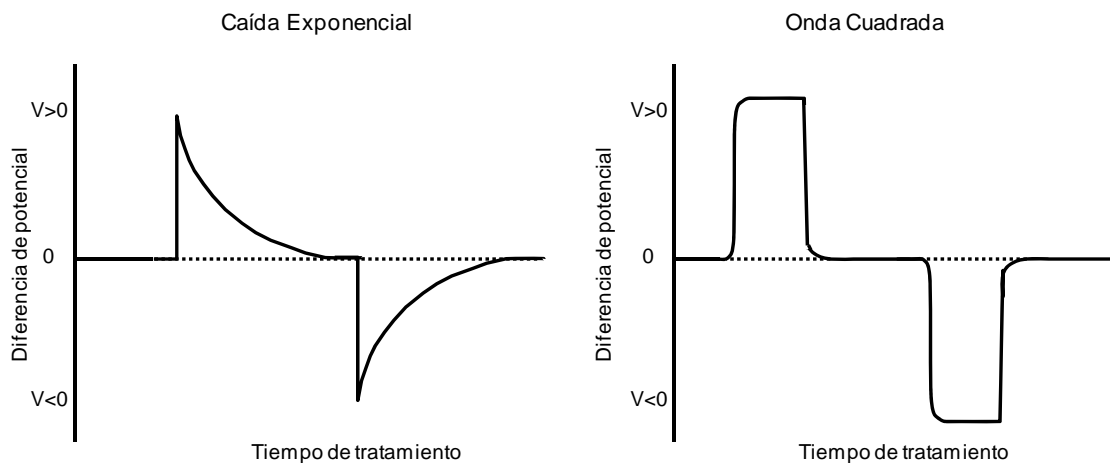


Figura 1.4. Forma de los pulsos bipolares de caída exponencial y onda cuadrada.

Para poder caracterizar el pulso, hay que determinar la anchura del mismo. En los pulsos de onda cuadrada, este cálculo es inmediato y se corresponde con la duración del pulso. Para caracterizar la duración de los pulsos de caída exponencial, se ha propuesto definirla como el tiempo durante el cual la amplitud del pulso es superior al 37% del máximo de la descarga (Zhang *et al.*, 1995). En este caso, la duración del

pulso y la anchura propuesta del mismo, no coinciden (Figura 1.3). Esta definición hace más complicado el cálculo preciso del tiempo de tratamiento cuando se aplica este tipo de pulsos.

1.1.3.1.3. Tiempo de tratamiento

El tiempo de tratamiento se define como el tiempo total efectivo durante el cual se aplica el campo eléctrico. Matemáticamente se calcula multiplicando el número de pulsos aplicados por la anchura del pulso:

$$(Ec. 1.3) \quad t = \tau \cdot n$$

donde t es el tiempo de tratamiento, τ es la anchura del pulso y n el número de pulsos. Generalmente, tanto el tiempo de tratamiento como la anchura del pulso se expresan en microsegundos (μs), que cómo se expresará en esta Tesis Doctoral.

1.1.3.1.4. Frecuencia

La frecuencia se corresponde con el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo, y se expresa en hertzios (Hz). Los estudios de inactivación microbiana por PEAV se han llevado a cabo generalmente a frecuencias entre 0,5 y 500 Hz. En las cámaras estáticas, se suelen aplicar frecuencias entre 0,5 y 5 Hz para evitar el aumento de temperatura excesivo en la muestra (Raso *et al.*, 2000). En los tratamientos en flujo continuo, la frecuencia del tratamiento, junto con el caudal, determinan el número de pulsos aplicado, y por tanto, el tiempo de tratamiento.

1.1.3.1.5. Resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento

La resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento es un parámetro que condiciona la forma del pulso, la máxima diferencia de potencial alcanzada entre los electrodos durante la descarga del equipo o el calentamiento del producto al paso de la corriente eléctrica.

La resistencia eléctrica de la cámara depende de su geometría y de la conductividad del medio de tratamiento. Es directamente proporcional a la resistividad del medio de tratamiento (ρ) y a la distancia existente entre los electrodos (d) e inversamente proporcional a su área (A):

(Ec. 1.4)

$$R = \frac{\rho d}{A}$$

donde R es la resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento, expresada en ohmios (Ω), ρ es la resistividad, expresada en ohmios por metro (Ωm), d es la distancia entre electrodos, expresada en metros (m) y A , el área del electrodo, expresada en metros cuadrados (m^2).

La resistividad del medio de tratamiento es el valor inverso de su conductividad eléctrica (σ). La conductividad es una medida de la capacidad de un material para conducir la corriente eléctrica y depende de su fuerza iónica. En el S.I., la conductividad eléctrica se expresa en Siemens dividido por metro (S/m), aunque en la literatura se suele expresar con mayor frecuencia en miliSiemens dividido por centímetro (mS/cm).

1.1.3.1.6. Energía del pulso

La energía eléctrica de un pulso (W), aplicada sobre un producto, durante un tratamiento de PEAV se puede calcular teóricamente a partir de las siguientes expresiones, según se traten de pulsos de onda cuadrada o de caída exponencial:

$$(1.5a) \quad W = \frac{1}{2} \cdot V \cdot I \cdot t \quad \text{Para pulsos de caída exponencial.}$$

$$(1.5b) \quad W = V \cdot I \cdot t \quad \text{Para pulsos de onda cuadrada.}$$

donde t es la duración del pulso (s). Utilizando estas ecuaciones, puede determinarse, con razonable exactitud, la energía realmente aplicada, siempre que las medidas de la

diferencia de potencial, la intensidad de la corriente y la anchura del pulso se realicen lo más cerca posible de los electrodos de la cámara de tratamiento.

El cálculo teórico de la energía de un pulso, mediante las ecuaciones 1.5a y 1.5b es una aproximación a la realidad, puesto que en ellas se asume que los pulsos de caída exponencial tienen la forma exacta de un triángulo y que los pulsos de onda cuadrada son perfectamente cuadrados. En la práctica, la forma tanto de los pulsos de onda cuadrada como los de caída exponencial, no es totalmente regular. Por ello, para el cálculo más preciso de la energía eléctrica aplicada se recomienda el uso de la siguiente expresión, en la que el voltaje y la intensidad aplicados se obtienen mediante el registro continuo de estos parámetros con un osciloscopio durante el propio tratamiento:

$$(Ec. 1.6) \quad W = \int_0^{\infty} V \cdot I \cdot dt$$

donde V es la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de la cámara de tratamiento (V); I es la intensidad de corriente (A); t es el tiempo (s).

Con objeto de conocer el coste energético del proceso y poderlo comparar con otro tipo de tratamientos, es necesario conocer la energía por unidad de masa, o energía específica. Ésta se calcula dividiendo la energía aplicada por la masa (g) de producto procesado. Al multiplicar este valor por el número total de pulsos, se obtiene la energía específica total (W') expresada en J/g de acuerdo con el S.I.:

$$(Ec. 1.7) \quad W' = \frac{W \cdot n}{m}$$

donde W es la energía aplicada con cada pulso (J), n es el número de pulsos y m es la masa del producto (g). Normalmente, este valor se expresa en kJ/kg.

Algunos autores han sugerido el empleo de la energía específica, calculada a partir de la ecuación 1.6, como parámetro para caracterizar los tratamientos por PEAV sobre todo cuando se trabaja con pulsos de caída exponencial, debido a que en este caso su cálculo es más preciso que el de la anchura del pulso (Wouters *et al.*, 2001a).

Sin embargo, además de la energía específica, es necesario indicar la intensidad del campo eléctrico utilizado, pues se ha observado que tratamientos de la misma energía específica aplicados a distinta intensidad de campo eléctrico, tienen distinta eficacia (Álvarez *et al.*, 2003d; Pataro *et al.*, 2011).

1.1.3.2. Principales componentes de un equipo de PEAV

Para la aplicación de un tratamiento de PEAV, se precisa un sistema que permita la descarga intermitente de corriente eléctrica continua en una cámara de tratamiento, donde se genera un campo eléctrico de alta intensidad. Desde los inicios de la tecnología de los PEAV en los años 60, y gracias al desarrollo de la ingeniería eléctrica, estos sistemas son cada vez más potentes y compactos. A pesar de esta evolución, todo equipo posee un diseño o esquema básico similar: un generador de PEAV, una cámara de tratamiento y un sistema de control y toma de datos del proceso (Min *et al.*, 2007) (Figura 1.5).

1.1.3.2.1. Generador de PEAV

Está constituido básicamente por un generador de corriente eléctrica continua de alto voltaje, uno o varios condensadores, un interruptor y, en algunos casos, un transformador del voltaje del pulso.

El *generador de corriente* eléctrica continua transforma la corriente alterna de la red eléctrica en corriente continua. El *condensador*, o conjunto de condensadores, almacena dicha energía eléctrica que finalmente se descarga en la cámara de tratamiento a través del interruptor. El interruptor regula el paso de la corriente eléctrica desde el condensador a la cámara de tratamiento. En algunas ocasiones, el condensador o el conjunto de condensadores, no son capaces de almacenar toda la energía eléctrica requerida. En estos casos, un *transformador del pulso*, situado tras el interruptor, aumenta el voltaje de la señal pulsante al nivel seleccionado. Los generadores de última generación incluso no disponen de condensadores, ya que el transformador puede generar directamente la corriente eléctrica a la diferencia de potencial requerida (Puértolas, 2010a).

Las características técnicas del generador de PEAV, como la máxima diferencia de potencial, la máxima intensidad de la corriente, la duración y la forma del pulso y la frecuencia máxima de trabajo están determinadas a su vez por las características de cada uno de sus componentes.

El *interruptor* es una pieza de gran importancia en el generador de PEAV ya que impone las limitaciones de voltaje e intensidad de la corriente del equipo, así como la forma del pulso. Conforme ha evolucionado la tecnología, los interruptores se han ido perfeccionando, permitiendo trabajar cada vez con diferencias de potencial e intensidades de corriente más elevadas.

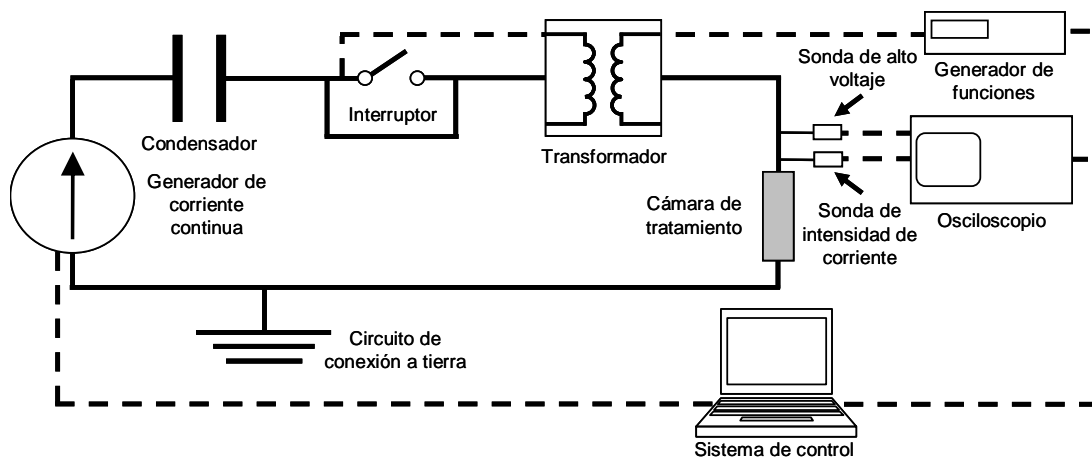


Figura 1.5. Esquema general de los principales componentes de un equipo de PEAV: un generador de PEAV (generador de corriente eléctrica continua de alto voltaje, condensador/es, interruptor, transformador del voltaje del pulso), una cámara de tratamiento y un sistema de control conectado a un generador de funciones y toma de datos del proceso (osciloscopio, sondas de alto voltaje y de intensidad de corriente).

Fundamentalmente se utilizan dos tipos de interruptores: interruptores para generar pulsos de onda cuadrada e interruptores para generar pulsos de caída exponencial. Los primeros son capaces de interrumpir el paso de corriente eléctrica, por lo que permiten la descarga parcial del condensador y dan lugar a pulsos de onda cuadrada. Los segundos no cierran el paso de corriente tras el inicio de la descarga, provocando la descarga total del condensador y dando lugar a pulsos de caída exponencial.

Como se ha indicado con anterioridad, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los pulsos de caída exponencial, ya que permiten tener un mejor conocimiento del tiempo de tratamiento aplicado. Sin embargo, los primeros

interruptores desarrollados para la aplicación de pulsos de onda cuadrada no permitían trabajar con voltajes muy elevados. Ello restringía el empleo de los pulsos de onda cuadrada a escala de laboratorio.

En los últimos años, esta importante limitación ha sido superada, en gran medida gracias al desarrollo de nuevos interruptores, cuyos máximos exponentes son los IGBT (“insulated gate bipolar transistor”). Estos interruptores tienen la capacidad de abrir y cerrar el paso de la corriente eléctrica a mayores diferencias de potencial y, por lo tanto, de originar pulsos de onda cuadrada. Actualmente, los más potentes permiten el paso de voltajes de hasta 6,5 kV y de intensidades de corriente de hasta 3000 A (de Haan, 2007). Estos valores siguen siendo insuficientes para las necesidades actuales (Mohan *et al.*, 1995). Sin embargo, la gran ventaja de los IGBT, es que se pueden conectar en serie (hasta 20) para llegar a los voltajes requeridos, partiendo incluso de interruptores de menor capacidad y, en consecuencia, más económicos (Gaudreau *et al.*, 2001). Además, los interruptores IGBT permiten aplicar frecuencias por debajo de 300 Hz (incluso inferiores a 1 Hz), algo que no soportan los interruptores IGCT (“insulated gate commutated thyristor”), quizás sus máximos competidores en prestaciones, que sólo permiten trabajar entre 300 y 500 Hz. Este hecho otorga más flexibilidad a la hora de diseñar experimentos a escala de laboratorio tanto en condiciones de flujo continuo, permitiendo aplicar el mismo número de pulsos a distintos niveles de caudal, modificando la frecuencia. Este hecho es muy importante, ya que permite comparar, utilizando el mismo equipo, los tratamientos realizados a escala de laboratorio en cámaras de tratamiento estáticas con los tratamientos en flujo continuo a escala de planta piloto.

1.1.3.2.2. Cámara de tratamiento

La cámara de tratamiento es el lugar donde se sitúa el producto para su tratamiento. Se compone de dos electrodos, uno de ellos conectado al generador de PEAV y el otro a tierra, separados por un material aislante (Huang y Wang, 2009). Entre los dos, debido a la diferencia de potencial, es donde se genera el campo eléctrico y, por tanto, donde se sitúa la muestra a tratar.

Los materiales con los que se fabrican las cámaras de tratamiento, tanto los electrodos como el aislante, no deben interactuar con los productos que se tratan y deben poder ser limpiados con facilidad e incluso esterilizarlos (Zhang *et al.*, 1995). Algunos de los materiales recomendados para la fabricación de los electrodos son el acero inoxidable o el grafito, mientras que para el aislante, se usan cerámicas o polímeros plásticos como el Delrin o el Metacrilato. Bushnell *et al.* (1993) consideraron más adecuados para la construcción de los electrodos o para su recubrimiento ciertos materiales inertes desde un punto de vista electroquímico como el oro, el platino o el carbono.

El diseño de la cámara de tratamiento depende de diversos factores como el tipo de aplicación (inactivación microbiana o mejora de la transferencia de masa), las características del equipo o las condiciones de tratamiento (estáticas o flujo continuo).

La geometría de los electrodos de la cámara es la característica fundamental para conseguir intensidades del campo eléctrico elevadas y lo más uniformes posibles (Alkhafaji y Farid, 2007). Si bien en algunas configuraciones es sencillo calcular la intensidad del campo eléctrico aplicada al producto, en otras, su especial geometría dificulta enormemente su determinación, como se verá posteriormente. En estos casos, se hace necesaria la utilización de herramientas informáticas basadas en técnicas de simulación numérica que permiten conocer la distribución del campo eléctrico, así como otros parámetros como la temperatura del medio de tratamiento o la distribución del flujo dentro de la cámara, en los tratamientos en flujo continuo (Qin *et al.*, 1995a; Qiu *et al.*, 1998; Fiala *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2002; Toepfl *et al.*, 2007b; Gerlach *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2009a; Puértolas *et al.*, 2010b, c, 2011).

Independientemente de la geometría del electrodo o de la aplicación, las cámaras de tratamiento pueden dividirse en cámaras diseñadas para aplicar tratamientos estáticos y cámaras construidas para el tratamiento en flujo continuo. Las cámaras para tratamientos estáticos son más indicadas para equipos a escala de laboratorio. Éstas se utilizan para realizar investigaciones básicas sobre los factores más importantes que afectan al proceso, ya que permiten un perfecto control de los parámetros de los tratamientos.

1.1.3.2.2.1. Cámaras estáticas

Las principales características de cualquier cámara estática son la facilidad de llenado y vaciado, la sencillez de limpieza y, en el caso de trabajar en procesos de inactivación microbiana, la posibilidad de su esterilización. De manera general y sin tener en cuenta la aplicación, en la literatura podemos encontrar dos tipos principales de cámaras estáticas, la configuración abierta y la cerrada.

1.1.3.2.2.1.1. Cámaras estáticas abiertas

Las primitivas cámaras de tratamiento estáticas, diseñadas en los años 60 para la inactivación microbiana por Sale y Hamilton (1967a, b) poseían una configuración abierta de electrodos paralelos. Su estructura básica consistía en dos electrodos de carbono, separados por una pieza de polietileno en forma de “U” abierta a la atmósfera por la parte superior (Figura 1.6). Este tipo de cámaras de tratamiento ha sido utilizado posteriormente por otros autores (Jayaram *et al.*, 1991; Grahl y Märkl, 1996). Su llenado es muy sencillo y permite modificar muy fácilmente la distancia entre los electrodos. Su principal inconveniente es que la intensidad máxima del campo eléctrico que se puede aplicar está limitada por la posible ruptura dieléctrica del aire que se encuentra sobre el producto (Huang y Wang, 2009). Por su fácil manejo, este tipo de cámaras se siguen utilizando en los pequeños equipos de electroporación, cuya finalidad es generar poros en las células para introducir marcadores o plásmidos, y no la inactivación microbiana. Para evitar la ruptura dieléctrica debida a la abertura de la cámara, se diseñaron las cámaras de tratamiento cerradas.

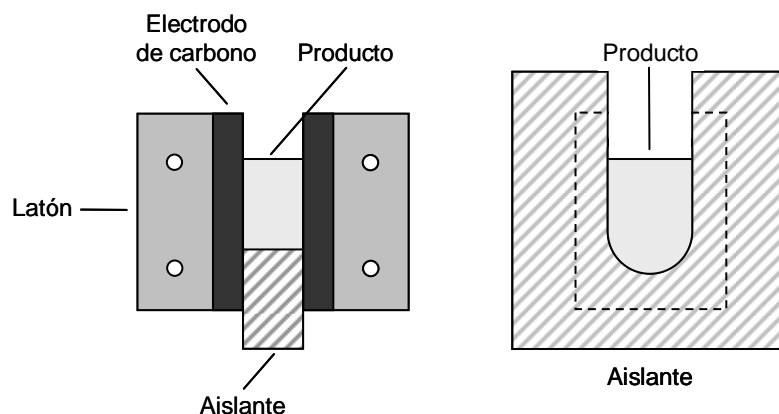


Figura 1.6. Esquema de la cámara estática de configuración abierta diseñada por Sale y Hamilton (1967a,b).

1.1.3.2.2.1.2. Cámaras estáticas cerradas

El diseño básico más utilizado en las cámaras estáticas cerradas consta de dos electrodos, constituidos por dos piezas metálicas paralelas, separados por un material aislante, que en este caso cierra completamente la cámara (Dunn y Pearlman, 1987; Qin *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996; Heinz *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2003a; Amiali *et al.*, 2004; El-Belghiti y Vorobiev, 2004; Schilling *et al.*, 2007; Corrales *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008, 2009; Puértolas *et al.*, 2009) (Figura 1.7). Al igual que las cámaras abiertas, las cámaras cerradas permiten modificar fácilmente su capacidad y la intensidad del campo eléctrico aplicada a un voltaje determinado. Como electrodos, se suelen utilizar piezas de acero inoxidable pulidas a espejo para garantizar la máxima uniformidad del campo eléctrico (Zhang *et al.*, 1996; Dunn, 2001).

El gran inconveniente de las cámaras cerradas es que presentan mayor dificultad para su llenado, que las abiertas. En el caso de productos líquidos, éste se realiza generalmente a través de un pequeño orificio, que se cierra antes del tratamiento, situado en el material aislante (Hülshager y Niemann, 1980; Zhang *et al.*, 1996; Raso *et al.*, 2000) o en uno de los electrodos (Dunn y Pearlman, 1987) (Figura 1.7). En ocasiones, para evitar la presencia de burbujas de aire, se recurre al llenado mediante vacío (Qiu *et al.*, 1998; Reina *et al.*, 1998).

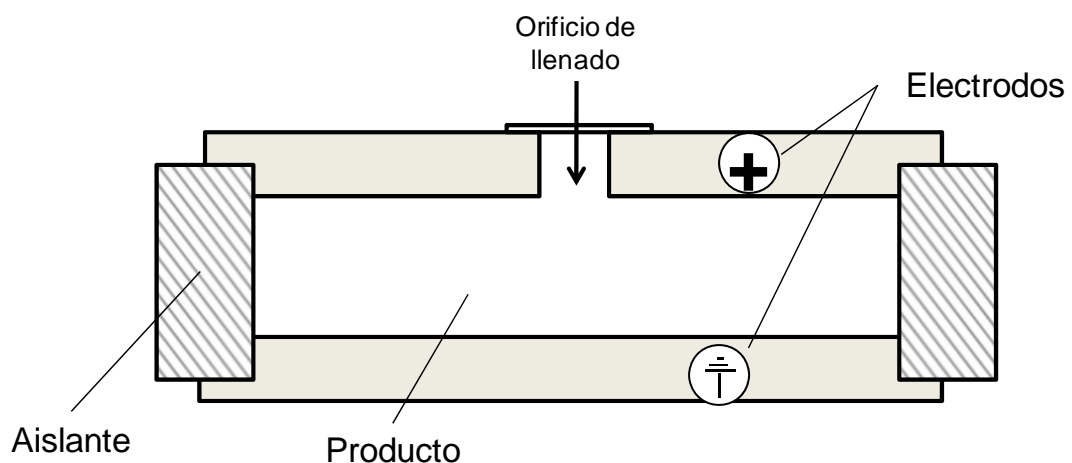


Figura 1.7. Diseño original de cámara estática de configuración cerrada (Dunn y Pearlman, 1987).

Una de las principales complicaciones que surge en la aplicación de los tratamientos de PEAV es que, si éstos son a una elevada intensidad del campo eléctrico o de muy larga duración, como ocurre en los tratamientos de inactivación microbiana, se puede producir un aumento considerable de la temperatura de la muestra. Para reducir este problema, algunas cámaras disponen de sistemas de refrigeración (Qin *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996; Góngora-Nieto, 2001; Amiali *et al.*, 2004). En las cámaras sin sistemas de control de temperatura, se aplican los pulsos una frecuencia suficientemente baja para que el calor generado se disipe a través de las paredes de los electrodos entre los pulsos aplicados (Raso *et al.*, 2000).

Recientemente, se han evaluado materiales plásticos conductores con el objeto de poder procesar alimentos contenidos en envases fabricados con ellos. De este modo, se pretende aplicar un tratamiento de PEAV al producto previamente envasado. Roodenburg *et al.* (2010), diseñaron y evaluaron una cámara cerrada de electrodos paralelos plásticos (Figura 1.8). El material utilizado fue acetato de etilenvinilo (“ethilen vinyl acetate”, EVA) con un 30% de carbón para aumentar su conductividad. Una capa de entre 10 y 100 μm de este copolímero, termosellable y flexible, se unió mediante un adhesivo de elevada conductividad a los electrodos del equipo de PEAV. Para comprobar la idoneidad del material y la eficacia del tratamiento de PEAV, trataron una suspensión de *Lactobacillus plantarum* en tampón fosfato de pH 5. Un tratamiento de 28 kV/cm durante un máximo de 30 μs consiguió una reducción de 2,1 ciclos logarítmicos de la población microbiana, alcanzando una temperatura máxima del medio de tratamiento de 36°C. Esta cámara es todavía un prototipo, si bien, por las características físicas del material plástico conductor (flexible, termosellable), abre la posibilidad de procesar industrialmente alimentos previamente envasados, reduciendo de este modo los problemas derivados de una contaminación post-tratamiento. Sin embargo, precisamente por el carácter flexible de este material, la posibilidad de que los electrodos no mantengan la forma en el envase hace que el campo eléctrico formado entre ellos no sea totalmente homogéneo, con lo que los tratamientos aplicados no serían los adecuados. Si bien el desarrollo de materiales plásticos con propiedades conductoras supone un gran avance para la tecnología de PEAV, el uso que se propone en esta investigación implicaría el procesado del producto por lotes, de forma discontinua, cuando una de las ventajas de los PEAV, respecto a otras nuevas

tecnologías de conservación, es la posibilidad de aplicar el tratamiento al producto en flujo continuo.

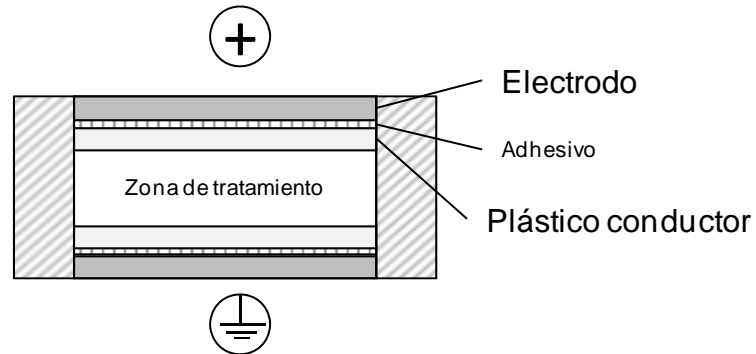


Figura 1.8. Esquema de la cámara de tratamiento de electrodos de plástico diseñada por Roodenburg *et al.* (2010).

Matsumoto *et al.* (1991) modificaron sustancialmente el diseño de electrodos paralelos inicial, dando origen al llamado diseño coaxial (Figura 1.9). En éste, uno de los electrodos es un cilindro hueco de acero inoxidable (electrodo de tierra) mientras que el otro es un cilindro sólido del mismo material situado en el interior del primero (electrodo de alto voltaje). El campo eléctrico se genera entre los dos electrodos siguiendo un esquema radial. En el diseño original de Matsumoto *et al.* (1991), la cámara se cerraba en los extremos con dos piezas de metacrilato. Tras los primeros experimentos, se añadió un sistema de agitación para mejorar la homogeneidad del tratamiento. Sin embargo, la agitación provocó que el campo eléctrico fuera mucho más intenso cerca del electrodo central que cerca del electrodo exterior, por lo que el diseño acabó descartándose.

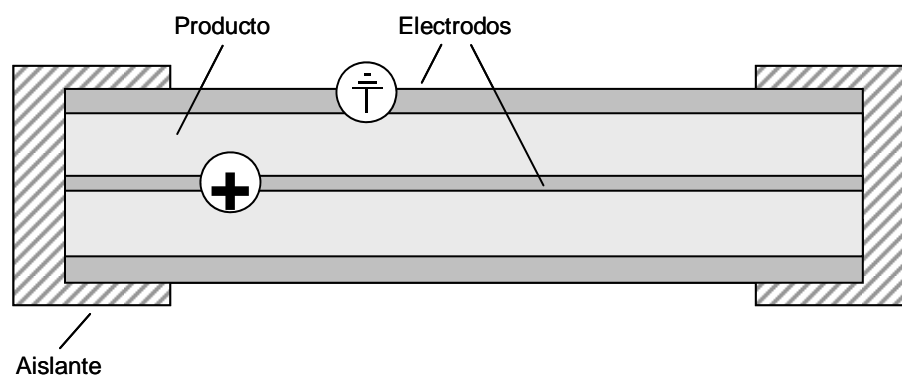


Figura 1.9: Diseño original de la cámara estática coaxial desarrollada por Matsumoto *et al.* (1991).

1.1.3.2.2.2. Cámaras de flujo continuo

Las cámaras de tratamiento en flujo continuo permiten simular los tratamientos requeridos en un proceso industrial. En este tipo de cámaras el problema de la uniformidad del tratamiento se agrava debido a que también hay que considerar la influencia del flujo. De manera simplificada, es posible agrupar la mayoría de las cámaras de flujo continuo en tres diseños diferentes: cámaras de electrodos paralelos, cámaras coaxiales y cámaras colineales (Álvarez, 2003c) (Figura 1.10).

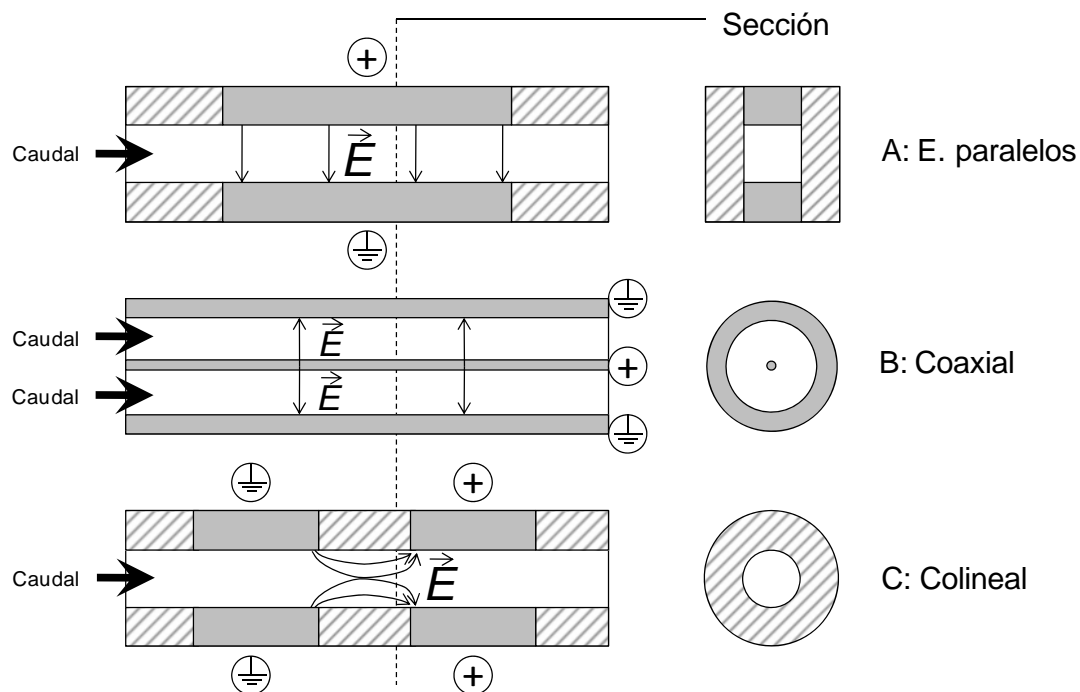


Figura 1.10. Principales diseños de cámaras de tratamiento de flujo continuo: diseño de electrodos paralelos (A), diseño coaxial (B) y diseño colineal (C).

1.1.3.2.2.2.1. Cámaras de flujo continuo de electrodos paralelos

La configuración de electrodos paralelos fue la primera en utilizarse en la construcción de cámaras de flujo continuo debido a que, teóricamente, permiten la aplicación de tratamientos de PEAV homogéneos debido a la distribución del campo eléctrico más uniforme que las otras configuraciones. Estas cámaras se componen de dos electrodos planos, dispuestos de forma paralela, separados por un material aislante

(Figura 1.10A). Una de sus características más importantes es que la dirección del campo eléctrico (E) se establece perpendicularmente a la del flujo del producto

Frente a los otros dos principales diseños, el coaxial y el colineal, la configuración de electrodos paralelos posee las ventajas de la uniformidad del campo eléctrico aplicado así como de su facilidad de cálculo. Además, los requerimientos de diferencia de potencial suministrada por el generador de PEAV para conseguir una determinada intensidad de campo eléctrico son menores que en las otras dos configuraciones. Sin embargo, debido a la gran superficie de los electrodos, los requerimientos de intensidad de corriente son más elevados que en otras configuraciones como la colineal (Jaeger *et al.*, 2009a). Otro inconveniente de este tipo de cámaras es que su sección cuadrada o rectangular puede dificultar la circulación de materiales líquidos con sólidos en suspensión o semisólidos. Por ello se han utilizado fundamentalmente para el estudio de la inactivación microbiana por PEAV en alimentos líquidos. Una de las primeras investigaciones sobre la aplicación de los PEAV en condiciones de flujo continuo fue llevada a cabo por Dunn y Pearlman en 1987. Una de las cámaras que diseñaron estos autores estaba constituida por dos láminas de acero inoxidable planas recubiertas por una membrana permeable al paso de iones con objeto de que el alimento no contactara directamente con los electrodos. Los materiales utilizados para la construcción de estas membranas fueron poliestireno sulfonado o copolímeros de ácido acrílico. La corriente eléctrica circulaba a través de electrolitos, como el carbonato sódico, el carbonato potásico o el hidróxido potásico, que fluían continuamente entre el electrodo y la membrana, con objeto de eliminar los productos formados como consecuencia de la electrolisis (Figura 1.11).

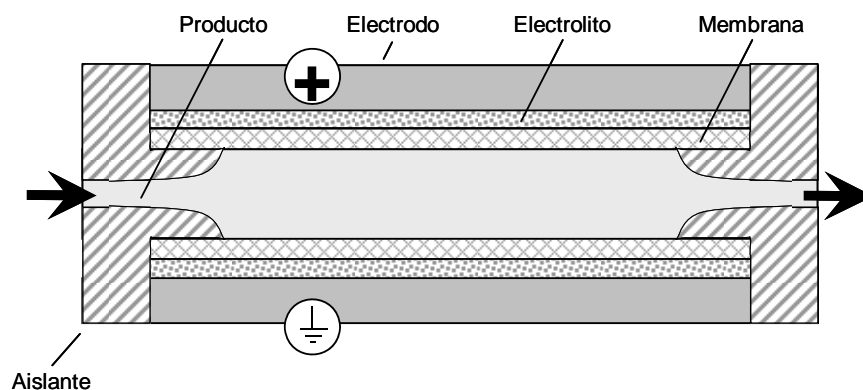


Figura 1.11. Diseño de la cámara de electrodos paralelos patentada por Dunn y Pearlman (1987).

Matsumoto *et al.* (1991) propusieron una modificación del diseño de electrodos paralelos tradicional, mediante la construcción de una cámara denominada de campo eléctrico convergente (Figura 1.12). En ella, entre dos electrodos con forma de disco y separados por 20 mm, se situaba una placa de teflón de 10 mm perforada con pequeños agujeros de diámetro y número variable, lo que producía la convergencia del campo eléctrico en esos orificios. El líquido se introducía de manera continua en el interior de la cámara y únicamente cuando pasaba por los orificios de la lámina de teflón recibía el tratamiento de PEAV. Aunque los resultados obtenidos por los autores eran prometedores, la presencia de ángulos de 90° en la zona de tratamiento provocaba elevados incrementos del campo eléctrico, que causaban a su vez aumentos puntuales de la temperatura y los correspondientes fenómenos de ruptura dieléctrica del medio (Huang y Wang, 2009). Basándose en este diseño, Sensory *et al.* (1997), y más recientemente Alkhafaji y Farid (2007), intentaron mejorar las cámaras de campo eléctrico convergente, eliminando y suavizando esos ángulos de 90°. Estos autores lograron reducir el incremento de temperatura y mejorar la homogeneidad del tratamiento, pero en la actualidad el diseño convergente parece descartado dada su complejidad.

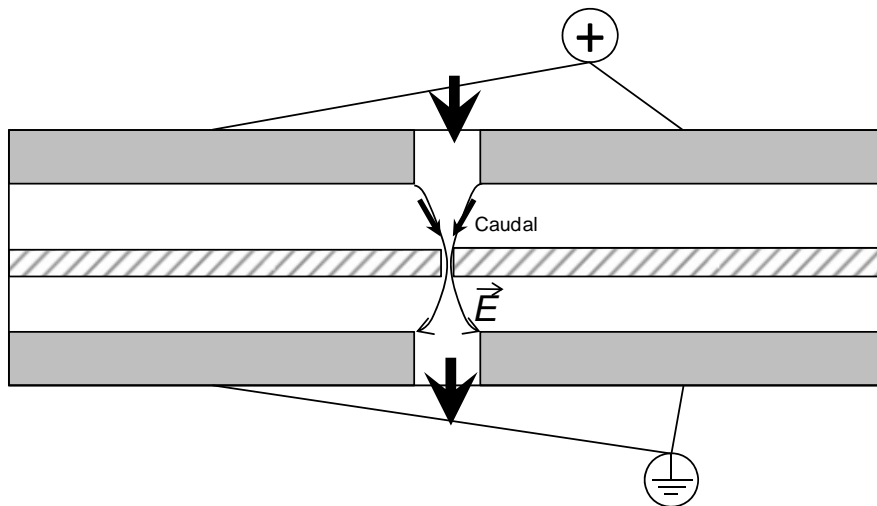


Figura 1.12. Esquema básico del diseño original de la cámara de electrodos paralelos de campo eléctrico convergente (Matsumoto *et al.*, 1991).

A finales de los años 90, el grupo del Profesor Knorr de la Universidad Técnica de Berlín comenzó a realizar los primeros ensayos de tratamiento de PEAV para la inactivación microbiana en flujo continuo, utilizando para ello una cámara de

electrodos paralelos (Ulmer *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2003). Esta cámara de sección cuadrada constaba de dos láminas de acero inoxidable que actuaban de electrodos, insertados en un cuerpo de Teflón, que a su vez ejercía de aislante (Figura 1.13). Debido a la alta intensidad de la corriente necesaria para los tratamientos y la falta de potencia de los equipos disponibles en los años 90, la distancia entre los electrodos de la cámara inicialmente construida era de 2,5 mm, por lo que no permitía procesar los alimentos a flujos elevados (hasta 5 L/h).

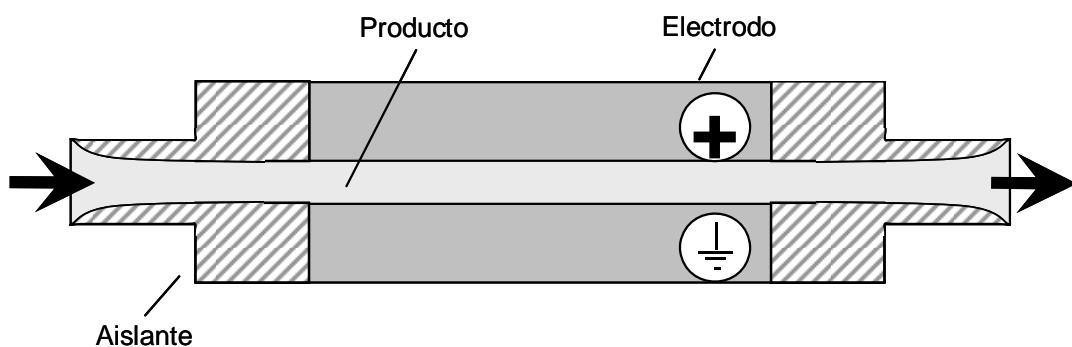


Figura 1.13. Esquema de la cámara de electrodos paralelos de flujo continuo diseñada en la Universidad Técnica de Berlín.

Recientemente, en el DIL (Quakenbrück, Alemania), se ha desarrollado una cámara de electrodos paralelos denominada cámara de borde concéntrico (Toepfl, 2009) (Figura 1.14). En esta cámara, los dos electrodos en forma de aro se sitúan en paralelo mediante dos cuerpos aislantes de cerámica, perforados internamente para permitir la circulación del producto. El campo eléctrico se dispone perpendicularmente a la superficie de los anillos. El fluido circula por el interior de uno de los anillos y se desplaza entre ellos, perpendicularmente a la dirección del campo eléctrico, para salir rodeando el exterior del segundo anillo. Con esta cámara, se han logrado tratar hasta 1000 L/h de agua con el fin de potabilizarla.

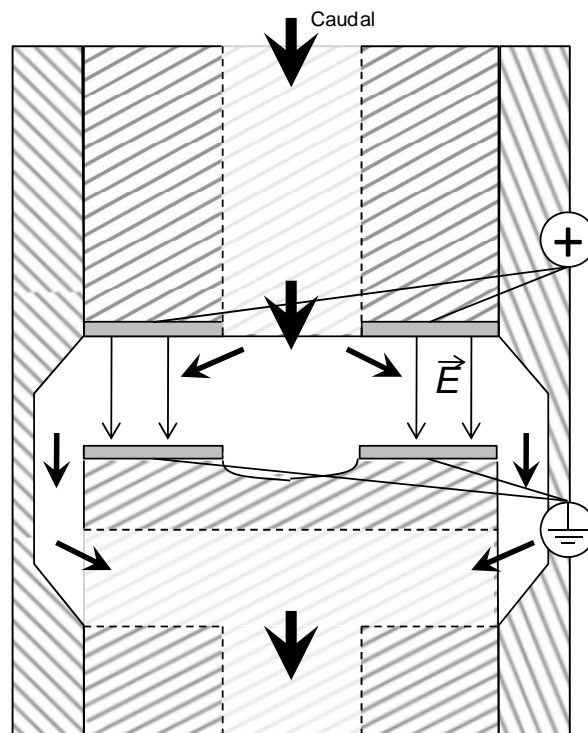


Figura 1.14: Esquema de la cámara de electrodos paralelos de borde concéntrico diseñada en el Instituto Alemán de Tecnología Alimentaria (DIL, Quakenbrück).

1.1.3.2.2.2. Cámaras de flujo continuo coaxiales

Las cámaras de flujo continuo coaxiales que se describen en la bibliografía (Bushnell *et al.*, 1993; Lubicki y Jayaram, 1997; Qin *et al.*, 1995a, 1997, 2000; McDonald *et al.*, 2000; Pizzichemi y Occhialini, 2007) se basan en gran medida en el diseño de cámara estática coaxial de Matsumoto *et al.* (1991), ya comentado. Estas cámaras de tratamiento constan de un electrodo interior cilíndrico rodeado de un electrodo exterior concéntrico (Figura 1.10B). Al igual que en las cámaras de electrodos paralelos, la diferencia de potencial se establece en dirección perpendicular a la del flujo del producto. El espacio entre los electrodos puede modificarse variando el diámetro del electrodo interno. Generalmente, el electrodo interior se conecta a alto voltaje mientras que el exterior se conecta a tierra (Esplugas *et al.*, 2001).

En este tipo de cámaras, la intensidad del campo eléctrico no posee una distribución uniforme. La intensidad del campo eléctrico en un punto depende de su posición entre los electrodos (Ge, 2005). Ésta se puede calcular a partir de la siguiente ecuación (Hofmann, 1984):

$$(Ec. 1.8) \quad E = \frac{V}{r \cdot \ln\left(\frac{R_2}{R_1}\right)}$$

donde E es la intensidad del 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 dos electrodos. Aunque el campo eléctrico no es completamente uniforme, este tipo de cámaras de tratamiento han sido bastante utilizadas, debido a su configuración simple y a la uniformidad del flujo que las atraviesa.

Todos los diseños coaxiales, hasta la fecha, se caracterizan por la gran superficie de sus electrodos, lo que exige la utilización de generadores muy potentes, incluso superiores a los necesarios para las cámaras de electrodos paralelos, para poder conseguir intensidades de campo eléctrico elevadas. Otra característica negativa de estas cámaras es que no permiten el tratamiento de grandes flujos de alimento ya que la distancia entre los electrodos es muy pequeña (Mastwijk y Bartels, 2001).

En las cámaras coaxiales desarrolladas inicialmente (Bushnell *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1995a), la presencia de cualquier pequeña protuberancia en los electrodos originaba la acumulación de gas. Esto provocaba irregularidades importantes en la distribución del campo eléctrico y frecuentes fenómenos de ruptura dieléctrica. Para evitar ambos problemas, Qin *et al.* (1997) modificaron el diseño inicial para que el gas no se acumulara en la cámara de tratamiento (Figura 1.15).

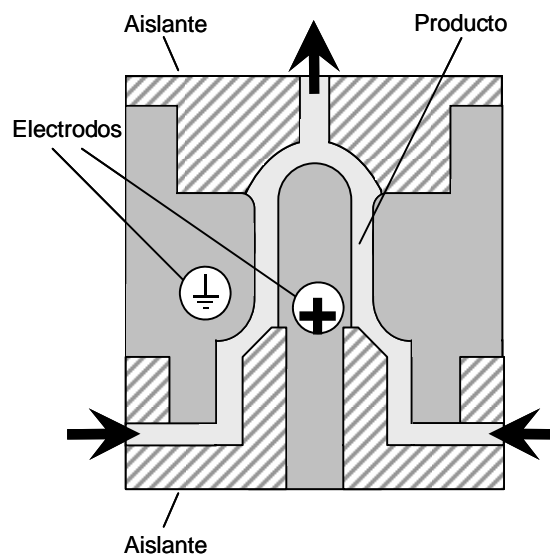


Figura 1.15. Esquema de la cámara coaxial de flujo continuo diseñada por Qin *et al.* (1997).

Más adelante, con el fin de mejorar la eficacia de esta cámara coaxial, los propios autores (Qin *et al.*, 2000) modificaron la superficie de los electrodos como se observa en la Figura 1.16. Esta configuración aumentaba la resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento, sin variar el espacio entre los electrodos, con lo que la intensidad de corriente necesaria para la aplicación de los tratamientos de PEAV era menor. Además, la superficie ondulada de los electrodos inducía cierta agitación del producto tratado, lo que se traduce en una mejora de la eficiencia del proceso. Sin embargo, la superficie rugosa del electrodo favorecía la formación y acumulación de burbujas de gas, con el consiguiente riesgo de ruptura dieléctrica.

Más recientemente, Pizzichemi y Occhialini (2007) diseñaron una cámara coaxial cuya principal novedad radicaba en que el electrodo interno era móvil, lo que permitía modificar el espacio entre los electrodos, en función de la conductividad del medio de tratamiento, lo que la hacía muy versátil para tratar distintos alimentos.

1.1.3.2.2.3. Cámaras de flujo continuo colineales

El diseño colineal consiste básicamente en dos discos de acero inoxidable u otro material conductor, a modo de electrodos, separadas por disco de material aislante (Figuras 1.10C y 1.17). Uno de los electrodos se conecta a alto voltaje, mientras que el otro lo hace a tierra. En este caso, al contrario que en el resto de diseños, la diferencia de potencial se establece en la misma dirección que el flujo del producto.

A diferencia de las cámaras de electrodos paralelos y las coaxiales, el diseño colineal reduce considerablemente la superficie de los electrodos y, en consecuencia, la intensidad de corriente requerida para generar una determinada diferencia de potencial (Dunn, 2001). Por ello, estas cámaras resultan en general más ventajosas desde un punto de vista energético. Además, su sección circular permite un fácil acoplamiento de la cámara a las conducciones tubulares utilizadas en la industria. El principal inconveniente de las cámaras de tratamiento de diseño colineal es que la distribución del campo eléctrico en la zona de tratamiento no es uniforme (Van den Bosch, 2007; Gerlach *et al.*, 2008). Esta falta de homogeneidad es especialmente crítica en aquellas aplicaciones que tienen como objetivo la pasteurización de los alimentos, en las que es necesario garantizar que todas las partes del producto reciben

un tratamiento mínimo necesario para garantizar la inactivación de la flora patógena. Por ello, para una futura aplicación de la tecnología de los PEAV con cámaras colineales a nivel industrial, es fundamental la correcta definición de la distribución del campo eléctrico en ellas (Góngora-Nieto, 2001; Lindgren, 2001). La medida directa del campo eléctrico en este tipo de cámaras mediante la introducción de sondas no es posible ya que, por un lado, las dimensiones de las cámaras son muy reducidas, y por otro, porque la introducción de elementos en la zona de tratamiento perturbaría la distribución del campo eléctrico aplicado. Es por ello que, para conocer la intensidad del campo eléctrico en cada punto de la zona de tratamiento, en la actualidad, se están utilizando técnicas de simulación numérica (Fiala *et al.*, 2001; Lindgren, 2001; Lindgren *et al.*, 2002; Van den Bosch, 2007; Toepfl *et al.*, 2007b; Gerlach *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2009a; Puértolas 2010b, 2011).

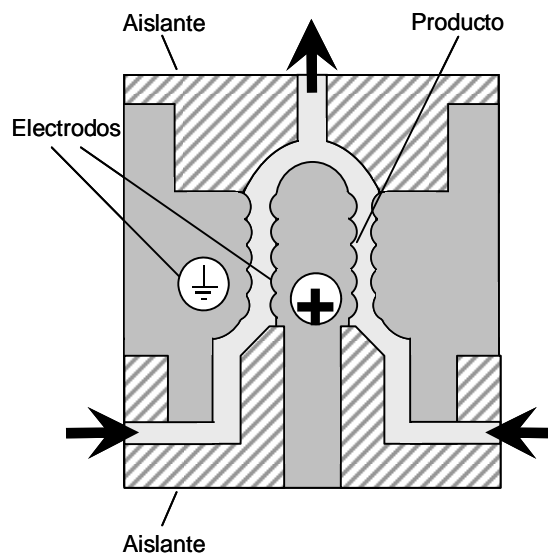


Figura 1.16. Modificación realizada por Qin *et al.* (2000) de la cámara de tratamiento coaxial diseñada por Qin *et al.* en 1997.

Uno de los métodos de simulación numérica más utilizados es el método de elementos finitos (MEF). Éste se basa en dividir el cuerpo o estructura (denominada “dominio”) en una serie de subdominios no intersectantes entre sí denominados

“elementos finitos”. Dentro de cada elemento, se distingue una serie de puntos denominados “nodos” que unidos entre sí forman una malla. Una serie de ecuaciones integrales, denominadas “ecuaciones de gobierno”, definen el sistema. Éstas se resuelven en cada uno de los nodos, interpolándose el resultado al resto de la estructura con el consecuente ahorro computacional (Ferziger y Peric, 2002).

En la actualidad, el desarrollo de aplicaciones informáticas, como Comsol Multiphysics[®], especialmente diseñadas para el cálculo de variables físicas mediante MEF, ha facilitado la posibilidad de estimar no sólo la intensidad del campo eléctrico, sino también la temperatura e incluso el flujo del producto en el interior de las cámaras de tratamiento en continuo. Por ello, el uso de este tipo de programas es básico, tanto para conocer la distribución de estas variables físicas en las cámaras ya construidas, como para el diseño inicial de las propias cámaras. Estas herramientas permiten la optimización de las dimensiones de las cámaras para obtener el campo eléctrico lo más uniforme posible, así como evitar las recirculaciones del producto y las zonas de elevada temperatura (Van den Bosch, 2007; Gerlach *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2009a).

A partir de los datos de las simulaciones y con objeto de comparar los resultados entre las diversas cámaras colineales desarrolladas, en la literatura se pueden encontrar básicamente dos maneras distintas de definir numéricamente el campo eléctrico aplicado. Toepfl *et al.* (2007b) propusieron utilizar la intensidad del campo eléctrico en el punto central de la línea media de la zona de tratamiento (punto A en la Figura 1.17). Este valor equivale al mayor campo eléctrico que recibe el producto que pasa por el eje central de la cámara de tratamiento, que es la zona donde el campo eléctrico aplicado es menor. Por otro lado, Jaeger *et al.* (2009) han propuesto recientemente definir el tratamiento mediante el campo eléctrico medio del eje central de la zona de tratamiento (valor medio del campo eléctrico entre los puntos B y C de la Figura 1.17).

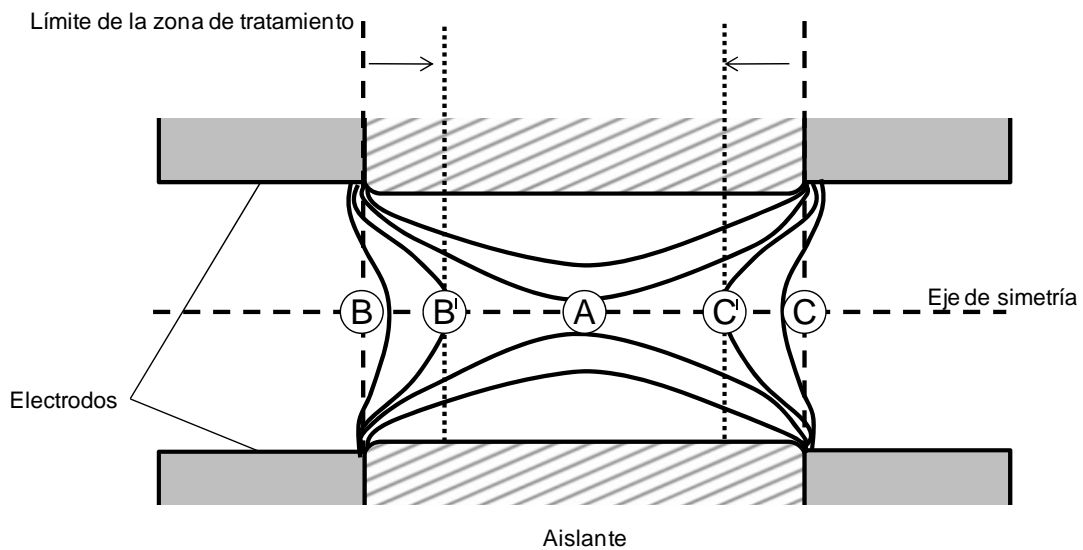


Figura 1.17. Puntos propuestos para la caracterización de la intensidad del campo eléctrico en un tratamiento de PEAV mediante cámaras colineales. *A* se corresponde con el centro del eje de simetría de la zona de tratamiento; *B* y *C*, con los extremos del eje de simetría de la zona de tratamiento; *B'* y *C'*, con los extremos del eje de simetría de la zona de tratamiento reducida.

Si bien ambos sistemas propuestos son adecuados para comparar resultados, éstos pueden originar problemas importantes en el caso de los estudios de inactivación microbiana. Así, que el valor del campo eléctrico utilizado para definir el tratamiento corresponda al necesario para obtener la pasteurización de un determinado producto, ciertamente no significa que todo el producto haya recibido ese tratamiento. Por ello, en el caso de los tratamientos de inactivación microbiana, lo más conveniente sería definir el tratamiento en función del campo eléctrico más bajo obtenido en la zona de tratamiento (puntos *B* o *C* de la Figura 1.17), de forma análoga a como se trabaja en los tratamientos térmicos donde se toma como referencia, para caracterizar el tratamiento, el punto del envase donde más tarde se alcanza la temperatura de procesado. Con este sistema, se definiría la intensidad del campo eléctrico del tratamiento en las cámaras colineales como la mínima intensidad aplicada, con lo que se aseguraría que todo el producto ha recibido como mínimo ese tratamiento. Sin embargo, este planteamiento suscita un nuevo problema, delimitar la zona de tratamiento. Cuanto más bajo sea el valor del campo eléctrico en el punto de menor intensidad de la zona de tratamiento, mayores serán los requerimientos energéticos

para poder aplicar el tratamiento mínimo que asegure la consecución del objetivo. Para evitar que éste valor sea demasiado bajo, los límites laterales de la zona de tratamiento se pueden reducir (puntos B' o C' de la Figura 1.17), desestimando el tratamiento que reciba el producto fuera de esos límites, aunque reduciendo en consecuencia la zona efectiva de tratamiento.

La configuración colineal comenzó a estudiarse para la aplicación de tratamientos de inactivación microbiana. En este caso, debido a los elevados campos eléctricos necesarios, la distancia entre los electrodos era muy pequeña (del orden de mm) por lo que también lo era el volumen de la cámara de tratamiento y, como consecuencia, el tiempo de residencia. Ello provocaba que fuera necesario utilizar frecuencias de tratamiento muy elevadas para que el producto recibiese un número de pulsos suficiente.

La primera aproximación al diseño colineal para el tratamiento de PEAV en flujo continuo fue llevada a cabo por Dunn y Pearlman (1987) (Figura 1.18). Su especial diseño permitía la eliminación del interruptor del circuito. Así, el generador de corriente continua estaba conectado directamente con la cámara de tratamiento. La cámara consistía en varios electrodos circulares de acero inoxidable conectados al generador de PEAV, separados por piezas circulares de material aislante. Cuando el producto circulaba a través de ella, se generaba un campo eléctrico intenso en las zonas más estrechas de los aislantes, mientras que en las zonas donde sus paredes se alejaban, la intensidad del campo eléctrico era menor. De esta manera, el número de pulsos era determinado por el número de piezas aislantes, y la anchura de los mismos por la velocidad de flujo. La ausencia del interruptor de este diseño suponía la aplicación continua de corriente eléctrica, lo que a nivel práctico, limitaba su aplicación a escala industrial al encarecer enormemente el proceso (Zhang *et al.*, 1995).

Con objeto de solventar los problemas del diseño colineal, Yin *et al.* (1997) construyeron y patentaron una configuración consistente en una sucesión de cámaras colineales conectadas en serie (Figura 1.19). Con el fin de que la temperatura del producto no alcanzara valores muy elevados, entre las cámaras se situaban intercambiadores de calor que se sumergían en un baño de agua a baja temperatura. Esta patente de la Universidad de Ohio (OSU) dio lugar al desarrollo, junto con la

empresa Diversified Technologies (Bedford, EE.UU.), a uno de los primeros equipos de PEAV a escala planta piloto o semi-industrial para la inactivación microbiana, el llamado sistema OSU (hasta 6000 L/h). Otros autores propusieron más adelante el uso de cámaras colineales conectadas en serie (Qiu *et al.*, 1998; Lindgren *et al.*, 2002). Si bien la inclusión de intercambiadores de calor entre las cámaras evitaba los efectos térmicos, en principio no deseados, la necesidad de un sistema de refrigeración hace que estas instalaciones tengan un gasto energético adicional.

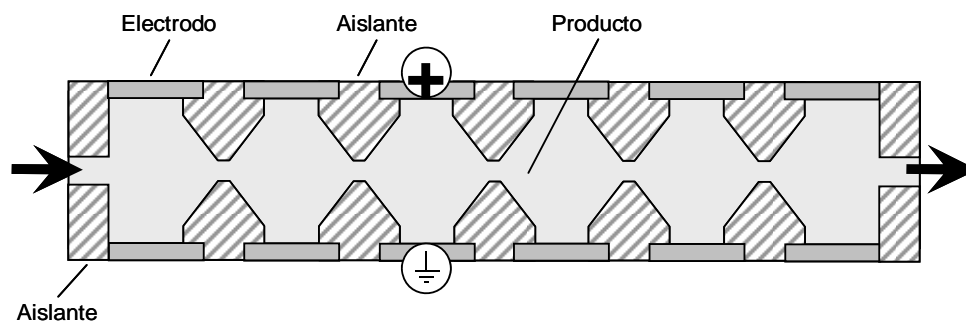


Figura 1.18. Esquema de la cámara de flujo continuo diseñada por Dunn y Pearlman (1987) para la supresión del interruptor del circuito eléctrico.

Más adelante, Mastwijk y Bartels (2001) desarrollaron una cámara de tratamiento basada en el diseño colineal, aunque con ciertas modificaciones (Figura 1.20). Ésta consta de 5 electrodos, uno de ellos conectado a tierra y los otros cuatro a alto voltaje, separados por el material aislante. Aunque entre cada par de electrodos el campo eléctrico es relativamente homogéneo, a lo largo de la cámara se establece cierto gradiente de intensidades. Por lo tanto, este diseño posee los mismos problemas de falta de uniformidad del campo eléctrico de los que adolece el diseño de Yin *et al.* (1997), sin aportar mejoras consistentes.



Figura 1.19. Configuración de cámaras colineales conectadas en serie patentada por Yin *et al.* (1997).

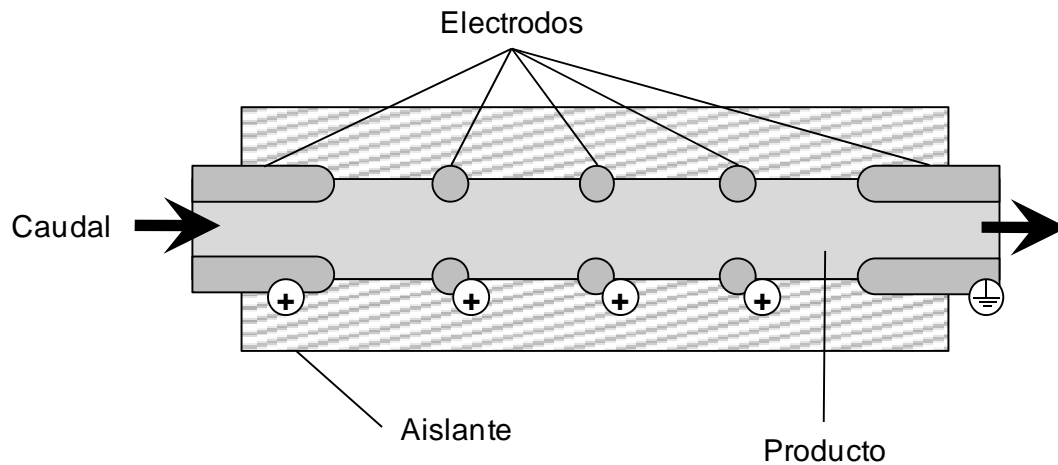


Figura 1.20. Diseño general de la cámara de tratamiento de flujo continuo de Mastwijk y Bartels (2001).

Basándose en diseños anteriores (Fiala *et al.*, 2001; Lindgren, 2001), Toepfl *et al.* (2007b) desarrollaron una cámara colineal para la aplicación de tratamientos de inactivación microbiana (Figura 1.21). Ésta constaba de tres electrodos de acero inoxidable, separados por dos piezas de material aislante. El electrodo central estaba conectado a alto voltaje y los laterales, a tierra. La cámara definida por Toepfl *et al.* (2007b) poseía dos zonas de tratamiento entre los electrodos, de 4 mm de diámetro y 6 mm de longitud. En este diseño, la superficie de los electrodos y del material aislante no estaba al mismo nivel. El diámetro interno de los electrodos (6 mm) era algo mayor que el de las piezas aislantes (4 mm). Además, los bordes de estos salientes estaban redondeados para evitar los ángulos de 90°. Este particular diseño permitía aumentar la intensidad del campo eléctrico en la zona de tratamiento, así como mejorar la uniformidad del tratamiento. Sin embargo, aun con esta mejora, la distribución del campo eléctrico en el interior de la cámara no era totalmente uniforme.

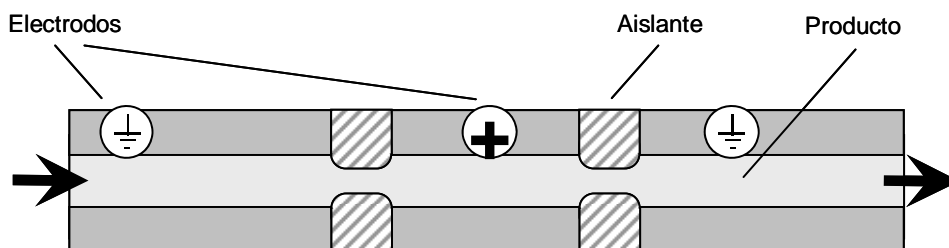


Figura 1.21. Esquema básico de la cámara colineal de flujo continuo desarrollada por Toepfl *et al.* (2007b).

Posteriormente, con objeto de mejorar la distribución del campo eléctrico, Gerlach *et al.* (2008) desarrollaron un modelo matemático para calcular el radio que han de tener los bordes del material aislante, en función de los diámetros internos. Además, estos autores estudiaron la distribución de la temperatura y el flujo en éste tipo de diseños observando que, en las zonas tras los salientes del material aislante, existían recirculaciones del producto que originaban aumentos considerables de la temperatura. Estos puntos o zonas, denominados “hot spots”, están relacionados con la aparición de burbujas y de fenómenos de ruptura dieléctrica en este tipo de diseños (Puértolas *et al.*, 2008). Además, las elevadas temperaturas alcanzadas en ellos pueden provocar la inactivación tanto de microorganismos como de enzimas, así como la pérdida de propiedades organolépticas y nutritivas termosensibles de los alimentos (Gerlach *et al.*, 2008).

Con la finalidad de evitar esos “hot spots” y de provocar un flujo turbulento en la zona de tratamiento que mejorara la uniformidad del mismo, Jaeger *et al.* (2009a) desarrollaron un sistema que consistía en situar cuatro mallas de acero inoxidable (350 µm de tamaño de rejilla) perpendiculares a la dirección del flujo, justo antes y después de las zonas de tratamiento. Con ellas, no sólo consiguieron en gran medida los objetivos planteados, sino que también mejoraron la distribución del campo eléctrico y aumentaron a su vez su intensidad en la zona de tratamiento. Sin embargo, estas mallas podrían suponer un problema en el tratamiento de algunos líquidos viscosos o con partículas en suspensión.

1.1.3.2.3. Sistema de control y toma de datos

El sistema de control debe regular todo el proceso de aplicación de los PEAV: la carga del condensador a partir del generador de corriente a un voltaje determinado, la descarga del condensador, la frecuencia de los pulsos y el tiempo de tratamiento. Además, el equipo tiene que disponer de un sistema que registre los parámetros del proceso tales como la forma del pulso, el número de pulsos, el voltaje y energía aplicados, 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, se deben utilizar sondas

adecuadas conectadas a un osciloscopio. Éste, además de recoger los valores, integrarlos y calcular diferentes parámetros del proceso, puede estar conectado a un ordenador donde se almacenan todos los datos. El ordenador a su vez puede estar conectado a otros dispositivos para controlar todo el proceso.

Debido a los altos voltajes y a las elevadas intensidades de corriente, las sondas de medida de estos parámetros son especiales para este tipo de aplicaciones. Tanto las sondas como el osciloscopio deben tener una respuesta de banda ancha de al menos 100 MHz (Góngora-Nieto *et al.*, 2002).

Otro tipo de sondas de control necesarias son las de temperatura. La temperatura no es un parámetro eléctrico propiamente dicho, pero tiene una influencia importante sobre otros parámetros como la conductividad del medio, la intensidad del campo eléctrico, la anchura del pulso o la energía aplicada (Heinz *et al.*, 1999). Las sondas normalmente utilizadas para la lectura de la temperatura son termopares (Wouters *et al.*, 1999; Aronsson y Rönner, 2001) o sondas de temperatura de fibra óptica (Zhang *et al.*, 1994b; Ravishankar *et al.*, 2002). No obstante, también es posible calcular el incremento de temperatura de forma indirecta a través de la energía aplicada en sistemas en continuo o de la diferencia de potencial e intensidad de corriente entre el primer pulso aplicado y el último en sistemas con cámaras estáticas (Heinz *et al.*, 1999).

1.1.4. Inactivación microbiana mediante PEAV

Los campos eléctricos externos tienen como principal efecto la electroporación. Basado en este efecto, se han sugerido distintas aplicaciones de la tecnología de PEAV en la industria alimentaria, como son la mejora de los procesos de transferencia de masa y la inactivación de microorganismos. Esta Tesis Doctoral se centra en esta última aplicación.

Para lograr la inactivación de microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos, es necesario aplicar tratamientos por encima de los 10 kV/cm, aunque, generalmente, para conseguir una inactivación significativa son necesarios valores superiores a 20 kV/cm. La capacidad de inactivar microorganismos por los PEAV se debe a la formación de poros irreversibles en las envolturas celulares, como se ha descrito previamente en el apartado de Mecanismo de Acción de los PEAV (1.1.2). El aumento de la demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros con cualidades nutritivas y organolépticas similares al producto fresco, está haciendo que se investigue con más interés nuevos métodos de inactivación microbiana no térmicos que puedan sustituir a los tratamientos por calor. La capacidad de inactivación de microorganismos por PEAV sitúa a esta tecnología entre una de las más prometedoras en el campo de la conservación de los alimentos (Qin *et al.*, 1996; Ortega-Rivas, 2011).

1.1.4.1. Factores que afectan a la inactivación microbiana

La eficacia del proceso de inactivación microbiana mediante PEAV depende de diversos factores. Estos factores se pueden clasificar esencialmente en factores del proceso, características del microorganismo y características del medio de tratamiento (Wouters *et al.*, 2001a). Es necesario un adecuado conocimiento de la influencia de estos factores de manera individual y sus posibles interacciones, para poder evaluar adecuadamente el potencial de los PEAV como un sistema de inactivación microbiana eficaz.

1.1.4.1.1. Factores del proceso

La intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, la forma y la anchura del pulso, la frecuencia, la energía total y la temperatura son factores importantes a tener en cuenta en la inactivación microbiana por PEAV.

1.1.4.1.1.1. Intensidad del campo eléctrico

El campo eléctrico es uno de los factores más importantes que influyen en la letalidad de los PEAV. A la hora de evaluar este parámetro hay que considerar no sólo su intensidad sino también la distribución del campo eléctrico dentro de la cámara de tratamiento (Álvarez *et al.*, 2006). Por encima de un valor umbral, denominado campo eléctrico crítico, la inactivación microbiana aumenta al hacerlo la intensidad del campo eléctrico (Barssoti y Cheftel, 1999; Wouters *et al.*, 2001a). Este campo eléctrico crítico suele estar comprendido entre 2 y 14 kV/cm (Hülshager *et al.*, 1981, 1983; Castro *et al.*, 1993; Gásková *et al.*, 1996; Grahl y Märkl, 1996; de Jong y van Heesch, 1998). Por encima de ese campo eléctrico crítico y para un tiempo de tratamiento o nivel energético constante, algunos autores han observado que la inactivación microbiana aumenta exponencialmente al aumentar su intensidad (Hülshager, *et al.*, 1981; Grahl y Märkl, 1996; Pothakamury *et al.*, 1996). Sin embargo, otros autores han observado que tratamientos por encima de un determinado valor del campo eléctrico, no producen un aumento significativo en la inactivación microbiana (Wouters *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2003d).

La distribución del campo eléctrico dentro de la cámara es otro de los factores a considerar cuando se quiere conocer con precisión la influencia de este factor. Una distribución heterogénea del campo eléctrico en la cámara de tratamiento puede inducir a errores importantes en la estimación de su efecto. Por otro lado, la existencia de zonas donde se alcanzan campos eléctricos muy elevados puede provocar el aumento de la temperatura, lo que contribuiría al efecto letal de los tratamientos, por lo que la letalidad total sería consecuencia de una combinación de los dos efectos, el térmico y el debido al campo eléctrico.

1.1.4.1.1.2. Forma, anchura del pulso y tiempo de tratamiento

Se ha observado que, cuando se utilizan pulsos de la misma energía e intensidad de campo eléctrico, los pulsos de onda cuadrada son ligeramente más eficaces que los pulsos de caída exponencial (Qin *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994a; Pothakamury *et al.*, 1996; de Hann y Willcock, 2002; Amiali *et al.*, 2006). Se cree que la menor eficacia de los pulsos de caída exponencial es debida a que durante la fase de caída, a partir de determinado momento, el campo eléctrico aplicado está por debajo del campo eléctrico crítico necesario para la inactivación microbiana. Algunos autores han indicado que los pulsos eléctricos bipolares son más letales que los monopolares (Qin *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995). Qin *et al.* (1994) establecieron que este fenómeno podría relacionarse con que los pulsos bipolares provocan cambios de polaridad en las membranas y los consecuentes movimientos de cargas; en definitiva, un mayor estrés en la membrana celular, lo que facilitaría la electroporación. Sin embargo, otros autores como Beveridge *et al.* (2002), no observaron un incremento en la eficacia del proceso debido al uso de pulsos bipolares.

La relación de la inactivación microbiana con el tiempo de tratamiento se trata con más detalle en el apartado de Cinética de Inactivación Microbiana (1.2.4.2).

1.1.4.1.1.3. Frecuencia

En general se observa que, para el mismo tiempo de tratamiento y campo eléctrico, la inactivación microbiana es independiente de la frecuencia con la que se aplican los pulsos (Hülshager *et al.*, 1981; Raso *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2003b,c). Algunos autores han indicado que al aumentar la frecuencia de tratamiento aumenta el efecto letal de los PEAV (Gutierrez-Becerra *et al.*, 2002; Picart *et al.*, 2002; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2007). En estos estudios no se ha considerado que un aumento de la frecuencia supone un incremento de la energía específica aplicada por unidad de tiempo y, como consecuencia, un aumento de la temperatura del medio de tratamiento. Es bien conocido que la inactivación microbiana por PEAV aumenta con la temperatura por lo que, probablemente, el efecto atribuido a este factor es debido al mayor efecto letal de los tratamientos de PEAV a temperaturas más elevadas.

1.1.4.1.1.4. Energía específica

Se ha observado que la inactivación microbiana aumenta con la energía específica aplicada (Mizuno y Hori, 1988; Grahl *et al.*, 1992; Heinz *et al.*, 1999; Martín-Belloso *et al.*, 1997b; Sato *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2003). Desde un punto de vista práctico, es interesante establecer la intensidad de campo eléctrico y la anchura de pulso que permita obtener la máxima inactivación con el menor consumo energético. Schoenbach *et al.* (1997) observaron que para conseguir la misma inactivación microbiana en *Escherichia coli* era necesaria menos energía cuanto mayor era la intensidad del campo eléctrico y menor la anchura del pulso. Es decir que, para el mismo nivel energético, eran más eficaces pulsos de mayor amplitud y duración, que más cortos y de menor amplitud. Resultados similares sobre la inactivación de células vegetativas de *Bacillus subtilis* fueron obtenidos por Heinz *et al.* (1999) y por Heinz y Knorr (2000). Al igual que la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, la energía específica también determina el grado de permeabilización de la membrana. El número de células permeabilizadas de *Lactobacillus plantarum* aumentó, a distintas intensidades del campo eléctrico, cuando se aplicaban mayores niveles energéticos (Wouters *et al.*, 2001b).

Se ha propuesto el uso de la energía específica como parámetro de control en lugar del tiempo de tratamiento (Heinz *et al.*, 2001), especialmente cuando se aplican pulsos de caída exponencial, en los que la medida del tiempo de tratamiento no es muy precisa. Cuando la energía se utiliza con este propósito, es necesario calcularla integrando el área bajo la curva que define el pulso aplicado.

La energía específica no puede utilizarse por sí sola como parámetro para caracterizar un tratamiento de PEAV, sino que debe indicarse también la intensidad del campo eléctrico, ya que se ha observado que cuando se compara la eficacia de pulsos de la misma energía, son más eficaces aquellos que se aplican con una mayor intensidad de campo eléctrico. Sin embargo, la energía aplicada es un parámetro que incluye numerosos factores como la conductividad del medio, la anchura del pulso, el volumen de muestra tratada y la resistencia de la cámara de tratamiento, por lo que podría ser un parámetro muy adecuado para comparar resultados obtenidos en distintas condiciones experimentales e instalaciones (Heinz *et al.*, 2001).

1.1.4.1.1.5. Temperatura

Aunque los tratamientos de inactivación microbiana por PEAV se aplican a temperaturas por debajo de las consideradas letales para los microorganismos, los efectos letales de los PEAV aumentan de forma sinérgica al aumentar la temperatura del medio de tratamiento (Álvarez *et al.*, 2006). Este incremento ha sido observado tanto a temperaturas no letales (Zhang *et al.*, 1994c; Pothakamury *et al.*, 1996; Aronsson y Ronner, 2001; Hodgins *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2003; Fleischman *et al.*, 2004) como letales (Jayaram *et al.*, 1991; Reina *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2003; Hermawan *et al.*, 2004; Sepúlveda *et al.*, 2004, 2005). La ventaja del efecto sinérgico de esta combinación es la posibilidad de reducir la intensidad del tratamiento de PEAV para alcanzar un determinado nivel de inactivación microbiana (Heinz *et al.*, 2003; Álvarez y Heinz, 2007).

Coster y Zimmermann (1975) observaron que el incremento del nivel de inactivación, al aumentar la temperatura del medio de tratamiento, podría ser debido a la disminución del potencial transmembrana mínimo necesario para provocar la ruptura dieléctrica de la membrana celular. Esta disminución del potencial transmembrana podría explicarse por la transición de la fase de gel a la fase líquido-cristalina de los fosfolípidos de la membrana, inducida por ese aumento en la temperatura del medio (Stanley, 1991). Heinz *et al.* (2001) observaron que el campo eléctrico crítico para *Escherichia coli* (8 kV/cm), calculado de acuerdo con la forma y el tamaño del microorganismo, se vio significativamente reducido (5 kV/cm) cuando este microorganismo se trató a 42°C.

1.1.4.1.2. Características de los microorganismos

La inactivación microbiana por PEAV depende de distintos aspectos relacionados con el microorganismo que se va a tratar, como el tipo de microorganismo, su tamaño, su forma o las condiciones de cultivo.

1.1.4.1.2.1. Tipo de microorganismo

Mediante los tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje es posible inactivar las formas vegetativas de mohos, levaduras y bacterias. Los diferentes estudios estipulan que las levaduras son los microorganismos más sensibles a esta tecnología, y que, de forma general, las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativas (Sale y Hamilton, 1967a; Hülshager *et al.*, 1983; Qin *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1994a; Wouters y Smelt, 1997; Qin *et al.*, 1998). Sin embargo, otros parámetros como la cepa microbiana, el pH del medio o la temperatura de tratamiento pueden matizar esta afirmación general.

Dentro de una misma especie microbiana, pueden existir variaciones en la resistencia a los PEAV entre cepas. Por ejemplo, Lado y Yousef (2003) demostraron que, tras aplicar el mismo tratamiento de pulsos eléctricos (25 kV/cm, 144 μ s) a 9 cepas distintas de *Listeria monocytogenes*, los niveles de inactivación variaban entre 1,0 y 3,5 ciclos logarítmicos. Cebrián (2009) obtuvo resultados similares tras aplicar de un tratamiento de 26 kV/cm y 400 μ s a 28 cepas diferentes de *Staphylococcus aureus*. En este caso, observó una variación de la resistencia a los PEAV, desde 4,0 ciclos logarítmicos en la cepa más sensible hasta 0,1 ciclos logarítmicos en la más resistente. Otros autores, como Rodríguez-Calleja *et al.* (2006) con diferentes cepas también de *S. aureus*, o Somolinos *et al.* (2008a) con cepas de *E. coli*, encontraron también diferencias en la resistencia a los PEAV entre cepas del mismo microorganismo.

Aunque es posible inactivar células vegetativas mediante PEAV, los esporos bacterianos son resistentes a esta tecnología (Knorr *et al.*, 1994; Grahl y Märkl, 1996; Pagán *et al.*, 1998; Raso *et al.*, 1998a; Heesch *et al.*, 2000; Katsuki *et al.*, 2000; Cserhalmi *et al.*, 2002). Debido al peculiar mecanismo de acción de esta tecnología, los esporos bacterianos, cuyas membranas están protegidas por el córtex, son resistentes a estos tratamientos. En consecuencia, esta tecnología puede utilizarse como alternativa a los tratamientos térmicos de pasteurización, pero no a los de esterilización (Pagán *et al.*, 1998; Pol *et al.*, 2001). Por otra parte, en relación a las formas esporuladas no bacterianas, algunos estudios indican que es posible la inactivación de conidiosporos de algunos mohos y de ascosporos de algunas levaduras

por PEAV, si bien los ascosporos de *Neosartoria fischeri* son resistentes a estos tratamientos (Raso *et al.*, 1998a, 1998b).

1.1.4.1.2.2. Tamaño y forma de la célula

La resistencia microbiana a los PEAV parece estar relacionada con la forma, el tamaño de la célula y su posición respecto a la orientación del campo eléctrico (Qin *et al.*, 1991, 1998; Kehez *et al.*, 1996; Eynard *et al.*, 1998; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999; Heinz *et al.*, 2002; Toepfl *et al.*, 2006). La relación de estos factores con la resistencia microbiana a los PEAV podría explicar no solo la mayor sensibilidad de las levaduras frente a las bacterias, sino también las diferencias de resistencia entre cepas del mismo microorganismo (Lado y Yousef, 2003).

La influencia del tamaño en el efecto letal de los PEAV se ha relacionado con el potencial transmembrana creado por un campo eléctrico externo. Cuanto menor es el tamaño celular, menor es el valor del potencial transmembrana inducido por la acción de un determinado campo eléctrico y mayor es la resistencia del microorganismo al tratamiento (Zimmermann *et al.*, 1974; Hülshager *et al.*, 1983), como ya se ha explicado anteriormente (ecuación 1.1, en 1.1.2. Mecanismos de acción de los PEAV).

La forma también influye en el efecto del campo eléctrico sobre el potencial transmembrana. Toepfl *et al.* (2006), tomando como referencia las dimensiones de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* y *L. innocua*, establecieron matemáticamente que las células bacilares son más sensibles que las esféricas a la acción de un campo eléctrico, y que en las células de mayor tamaño, la intensidad de campo eléctrico necesaria para producir electroporación es menor que en células más pequeñas. Por otro lado, el potencial transmembrana de las células no esféricas depende de su orientación respecto a la dirección del campo eléctrico externo (Heinz *et al.*, 2001; Valic *et al.*, 2003). Este hecho es especialmente crítico cuando la distribución del campo eléctrico no es homogénea en la zona de tratamiento.

1.1.4.1.2.3. Fase de crecimiento y condiciones de cultivo

La fase de crecimiento es otro de los factores que influyen en la resistencia a la acción de un campo eléctrico externo. Se ha observado que las células en fase exponencial de crecimiento son más sensibles que las que se encuentran en la fase estacionaria (Jacob *et al.*, 1981; Hülshager *et al.*, 1983; Tatebe *et al.*, 1995; Gásková *et al.*, 1996; Pothakamury *et al.*, 1996; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998; Wouters *et al.*, 2001a; Álvarez *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2003). Este aumento en la sensibilidad puede ser debido al mayor tamaño de las células que se encuentran en la fase de división. Durante esta fase, las células aumentan de tamaño para después dividirse en dos. Por otro lado, la temperatura de incubación también afecta a la resistencia a los PEAV. Las investigaciones realizadas muestran que los microorganismos cultivados a temperaturas menores a las óptimas para su crecimiento son más sensibles que aquellos crecidos a su temperatura óptima de cultivo (Álvarez *et al.*, 2002, 2003c; Ohsima *et al.*, 2002; Russell, 2002; Cebrián *et al.*, 2007), aunque las diferencias en la resistencia no son importantes, nunca mayores a 1 ciclo logarítmico. La causa de estas variaciones en la sensibilidad pueden deberse a la diferente composición lipídica de las envolturas celulares. A menor temperatura de cultivo, las membranas presentan una mayor concentración en ácidos grasos insaturados, lo que hace que aumente la fluidez de la membrana (Tsuchiya *et al.*, 1987; Püttmann *et al.*, 1993). El aumento de la fluidez de la membrana podría ser la causa del aumento en la sensibilidad a los PEAV.

1.1.4.1.2.4. Condiciones de recuperación

Uno de los factores más importantes para determinar la resistencia microbiana a los PEAV es la cuantificación apropiada de los supervivientes. Las condiciones de recuperación como la temperatura y el tiempo de cultivo, o las características del medio de recuperación pueden afectar notablemente a la supervivencia de los microorganismos. Estas condiciones son más importantes si cabe, debido a la presencia de daño subletal en la población microbiana tras el tratamiento de PEAV (García *et al.*, 2003; Somolinos *et al.*, 2007, 2008a, 2008b). Tras la aplicación de un tratamiento de PEAV, una parte de la población muere y otra sobrevive, entre las cuales, algunas células sufren daños subletales lo que las hacen especialmente sensibles a determinadas condiciones que las células no dañadas toleran (García *et al.*,

2005b). Por lo tanto, si las condiciones de recuperación son óptimas (medio no selectivo), las células dañadas pueden reparar las lesiones, recuperarse y sobrevivir. Por el contrario, en condiciones desfavorables (medio selectivo), estas células dañadas mueren. La presencia de este daño subletal, abre un gran abanico de posibilidades a la hora de diseñar tratamientos combinados para aumentar la eficacia de los tratamientos (Mackey, 2000; Somolinos *et al.*, 2007).

1.1.4.1.3. Características del medio de tratamiento

Otro de los elementos a tener en cuenta a la hora de estimar la eficacia de un tratamiento de PEAV es el medio de tratamiento. Sus características físico-químicas pueden influir en la resistencia del microorganismo (por ejemplo el pH puede determinar la resistencia entre cepas del mismo microorganismo) y en el proceso aplicado (por ejemplo, una variación en la conductividad eléctrica puede modificar la energía aplicada en el tratamiento). Algunos factores clave son la conductividad eléctrica, el pH, la actividad de agua o la composición del medio.

1.1.4.1.3.1. Conductividad eléctrica

La influencia de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento en la inactivación microbiana por PEAV ha sido investigada por diversos autores (Jayaram *et al.*, 1993; Vega-Mercado *et al.*, 1996; Sensory *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 1999, 2001a; Álvarez *et al.*, 2000, 2003b). No obstante, el estudio de este parámetro de forma individual no es sencillo, puesto que la conductividad eléctrica afecta a distintos parámetros del proceso, como ya se ha indicado anteriormente (resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento, intensidad de corriente, diferencia de potencial y, por lo tanto, a la intensidad del campo eléctrico, etc.).

Para un mismo voltaje aplicado, cuanto mayor es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento, menor es el valor del campo eléctrico aplicado. La forma del pulso se puede modificar con la variación de conductividad, sobre todo en los pulsos de caída exponencial. En estos casos, el uso de la energía específica sería más adecuado como parámetro de caracterización del tratamiento (Álvarez *et al.*, 2006).

Wouters *et al.* (2001b) determinaron que para obtener el mismo nivel de inactivación en *Lactobacillus plantarum*, la energía necesaria era mayor si la conductividad era 16 mS/cm, que si era 4 mS/cm. Esto puede explicarse debido a la relación existente entre la resistencia del medio, el voltaje y la intensidad de corriente. Cuanto mayor es la conductividad del medio de tratamiento, menor es la resistencia, y por tanto, mayor es la intensidad de corriente necesaria para aplicar el mismo voltaje, lo que hace que la energía aplicada también sea mayor. Por lo tanto, la conductividad eléctrica es un parámetro cuyo efecto es difícil de determinar, porque no es posible analizarlo en iguales condiciones de tratamiento (intensidad del campo eléctrico, energía específica y tiempo de tratamiento). Álvarez (2003c) observó que tras la aplicación de tratamientos de PEAV de onda cuadrada a *Salmonella* Senftenberg, *L. monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, en condiciones controladas de intensidad del campo eléctrico y tiempo de tratamiento, la conductividad en un rango de 1 a 4 mS/cm no influía en la eficacia de los tratamientos, cuando éstos no superaban 30°C de temperatura final.

1.1.4.1.3.2. pH del medio de tratamiento

La influencia del pH del medio sobre la resistencia microbiana a los PEAV ha sido intensamente estudiada por diversos autores. Algunas investigaciones muestran que los microorganismos son más sensibles a pH ácido (Wouters *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2002; Geveke y Kozempel, 2003; Aronsson *et al.*, 2005); otros autores han indicado una mayor sensibilidad a pH neutro (Jeantet *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2000; García *et al.*, 2003); y en otras ocasiones no se ha observado efecto del pH (Heinz y Knorr, 2000; Ravishankar *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2003b).

La influencia del pH parece estar relacionada con el tipo de microorganismo. García *et al.* (2005a) observaron que tras el mismo tratamiento de PEAV, las seis bacterias Gram-negativas estudiadas presentaban más resistencia a los PEAV que las dos bacterias Gram-positivas en medio de pH ácido; sin embargo, en medio de pH neutro las bacterias Gram-positivas resultaron ser más resistentes que las Gram-negativas.

De manera general, la mayor resistencia de las bacterias Gram-positivas en medio de pH neutro parece estar relacionada con la aparición de daños en la membrana y su posterior reparación; por otro lado, en pH ácido las células se harían más sensibles a los PEAV apareciendo daños irreversibles en la membrana (García *et al.*, 2005a). En cuanto a las Gram-negativas, se ha observado la existencia de una población de bacterias dañadas subletalmente tras los tratamientos de PEAV en medio ácido (Somolinos *et al.*, 2008a). Por lo tanto, la capacidad de recuperación de ésta población dañada podría explicar la mayor resistencia de las Gram-negativas en medio ácido.

1.1.4.1.3.3. Actividad de agua

En los estudios de la influencia de la actividad de agua (a_w) en la inactivación mediante PEAV, se ha observado que, al disminuir la actividad de agua, aumenta la resistencia a los PEAV de diferentes bacterias y levaduras (Min y Zhang, 2000; Álvarez *et al.*, 2000, 2002, 2003b; Somolinos *et al.*, 2008a). Esto puede ser debido a que, cuando las células se encuentran en un medio de baja a_w , se produce una salida de agua del interior de los microorganismos al exterior y por tanto, una reducción de su volumen. Como ya se ha expuesto anteriormente, las células con un menor tamaño son más resistentes a la electroporación. Además, este fenómeno produce probablemente un estrechamiento de la membrana citoplasmática, seguido de una disminución de la permeabilidad y de la fluidez de la misma, lo que aumentaría también la resistencia de la célula a los PEAV (Neidhardt *et al.*, 1990).

El efecto de la reducción de la a_w en la inactivación microbiana por PEAV puede estar influido por el soluto utilizado con tal propósito. Álvarez (2003c) observó que una concentración de glicerol en el medio de tratamiento del 10% p/v, reducía la resistencia microbiana a los PEAV, a pesar de la disminución de la a_w (0,93).

1.1.4.1.3.4. Composición del medio

Si bien se han realizado diversas investigaciones sobre la influencia de la composición del medio de tratamiento en la resistencia microbiana a los pulsos

eléctricos, las diferentes condiciones de tratamiento y composición de los medios de tratamiento utilizados no permiten obtener conclusiones definitivas.

Hülshager *et al.* (1981) observaron que la resistencia de *E. coli* era mayor en presencia de sales en cuya composición había cationes divalentes como el Ca^{++} y el Mg^{++} . Grahl y Märkl (1996) observaron que la resistencia de *E. coli* a los PEAV aumentaba con la concentración de grasa de la leche. Jaeger *et al.* (2009b) han observado recientemente un efecto protector de las proteínas de la leche, especialmente las micelas de caseína, en la inactivación mediante PEAV de *Lactobacillus rhamnosus*. Por el contrario, otros autores han visto que la resistencia de *E. coli* o de *Bacillus cereus* en presencia de grasa o de proteínas era la misma que en tampones (Reina *et al.*, 1998; Mañas *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2001).

Por otro lado, la presencia de determinados componentes en el medio de tratamiento aumenta en cierta medida la eficacia letal de la tecnología de los PEAV. Por ejemplo, se ha descrito que la presencia de determinados compuestos, como algunos ácidos orgánicos (ácido benzoico o sórbico), bacteriocinas (como la nisina) o aceites esenciales (como el carvacrol) (Calderón-Miranda *et al.*, 1999a,b; Ziwei *et al.*, 2005; Mosqueda-Melgar *et al.* 2007; Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008; McNamee *et al.*, 2010; Martín-Belloso y Sobrino-López, 2011), incrementa la inactivación microbiana, detectándose en algunos casos incluso efectos sinérgicos (Álvarez *et al.*, 2006). Por ello, el efecto combinado de los PEAV con diversas sustancias antimicrobianas, como la nisina, la lisozima, la pediocina AcH, ácidos orgánicos o aceites esenciales, está sujeto a un profundo estudio en los últimos años (Dutreux *et al.*, 2000; Terebiznik *et al.*, 2000; Iu *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2000, 2001; Smith *et al.*, 2002; Ulmer *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2002, 2006; Gallo *et al.*, 2007; Somolinos *et al.*, 2007; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2008a).

1.1.4.2. Cinética de inactivación microbiana

Habitualmente, en el estudio de la resistencia microbiana frente a los distintos métodos de inactivación se utilizan las denominadas gráficas de supervivencia. En ellas, se representa el logaritmo decimal o neperiano del número de supervivientes para una determinada intensidad de tratamiento, frente al tiempo de tratamiento. Estas gráficas se suelen describir mediante distintos modelos matemáticos a partir de los cuales se obtienen diferentes parámetros que permiten cuantificar y comparar la resistencia microbiana. Las gráficas de supervivencia pueden ser lineales, cóncavas, convexas o sigmoideas (Xiong *et al.*, 1999; Periago *et al.*, 2002). Cuando la relación entre el logaritmo del número de supervivientes y el tiempo de tratamiento es una línea recta, resulta sencillo comparar la resistencia microbiana debido a que la velocidad de inactivación es constante e independiente del tiempo de tratamiento. Si las gráficas no muestran este tipo de perfil, la velocidad de inactivación depende del tiempo de tratamiento. En estos casos, se requieren modelos matemáticos más complejos para describir las gráficas de supervivencia. Además, en general, no se pueden obtener parámetros globales que permitan comparar la resistencia microbiana para cualquier condición de tratamiento, por lo que es necesario compararla en unas condiciones concretas que es necesario indicar.

Cuando se ha investigado la cinética de inactivación microbiana por PEAV, en la mayoría de los casos, se han obtenido gráficas de supervivencia cóncavas (Jayaram *et al.*, 1992, 1993; Álvarez *et al.*, 2000, 2002, 2003b, 2003d; Ohshima *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2005a,b; Cebrián *et al.*, 2007; Puértolas *et al.*, 2009) (Figura 1.22). En este tipo de gráficas, se observa que la velocidad de inactivación es progresivamente más lenta al aumentar el tiempo de tratamiento. En algunos estudios se ha indicado que la cinética de inactivación microbiana por PEAV sigue la tradicional cinética de primer orden, es decir, que existe una relación lineal entre el logaritmo del número de supervivientes y el tiempo de tratamiento. (Mizuno y Hori, 1988; Martín-Belloso *et al.*, 1997a, 1997b; Sensory *et al.*, 1997; Reina *et al.*, 1998; Heinz *et al.*, 1999). Sin embargo, en estos estudios la inactivación microbiana obtenida no suele superar los 3-4 ciclos logarítmicos, por lo que, probablemente, si se hubiera prolongado el tiempo de tratamiento para incrementar el número de ciclos de inactivación, hubiera disminuido la velocidad de inactivación con el tiempo, y la forma de las gráficas hubiera sido cóncava.

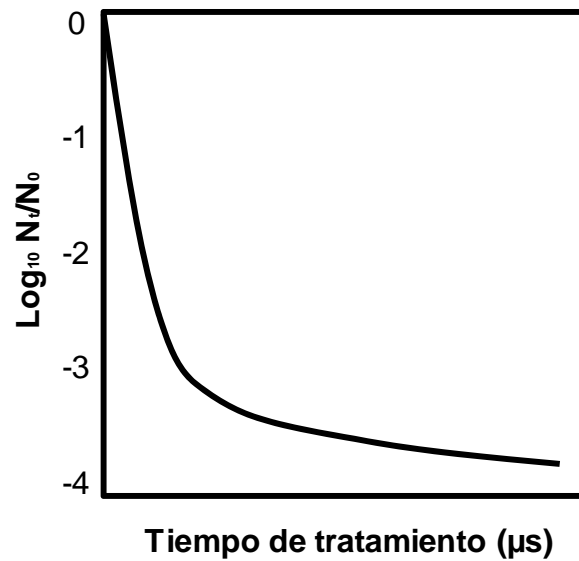


Figura 1.22. Ejemplo de gráfica de supervivencia cóncava obtenida en un tratamiento por PEAV.

1.1.4.2.1. Modelos primarios

Para estudiar la cinética de inactivación microbiana por PEAV y describir adecuadamente las gráficas de supervivencia obtenidas, se ha propuesto el uso de diferentes modelos matemáticos primarios.

En 1981, Hülshager *et al.* desarrollaron, por primera vez, un modelo específico para describir la cinética de inactivación microbiana mediante PEAV, en función del campo eléctrico (E) y el tiempo de tratamiento (t). Este modelo se basa en la existencia de dos relaciones lineales, una entre el logaritmo del número de supervivientes y el logaritmo del tiempo de tratamiento, y la otra entre el logaritmo del número de supervivientes y la intensidad del campo eléctrico:

$$(Ec. 1.9) \quad S(E, t) = \left(\frac{t}{t_c} \right)^{\left(\frac{E - E_c}{k} \right)}$$

donde S es la fracción de microorganismos supervivientes; k una constante propia de cada microorganismo; E_c la intensidad del campo eléctrico crítica para un tiempo de tratamiento determinado; t_c el tiempo de tratamiento crítico para una determinada intensidad del campo eléctrico. La peculiaridad de este modelo es que establece un tiempo de tratamiento crítico (t_c) y una intensidad del campo eléctrico crítica (E_c) por

encima de los cuales los tratamientos comienzan a ser letales para los microorganismos. El parámetro E_c se ha utilizado posteriormente para marcar los umbrales mínimos de inactivación de distintos microorganismos a un tiempo fijo de tratamiento (Álvarez *et al.*, 2006).

Posteriormente, Peleg (1995) desarrolló un modelo basado en la ecuación de Fermi para describir la relación entre la fracción de supervivientes (S) y la intensidad del campo eléctrico (E) para un número de pulsos determinado (n). Esta ecuación se ajusta a gráficas con forma sigmoidea. Los parámetros que utiliza este modelo son la intensidad del campo eléctrico crítica (E_c), que se corresponde con el punto de inflexión de la curva y representa el campo eléctrico necesario para inactivar el 50% de la población, y la pendiente de la parte lineal de la gráfica (a_c):

$$(Ec. 1.10) \quad S(E, n) = \frac{100}{1 + e^{\frac{E - E_c(n)}{a_c(n)}}}$$

Tanto el modelo de Hülshager *et al.* (1981) como el de Peleg (1995) son modelos específicamente desarrollados para los tratamientos de PEAV. Éstos describen adecuadamente la inactivación microbiana por lo que con ellos se puede caracterizar y comparar la resistencia microbiana además de estimar la inactivación microbiana que se consigue en unas determinadas condiciones de tratamiento (Grahl y Märkl, 1996; Sensory *et al.*, 1997). Sin embargo, estas ecuaciones fueron utilizadas para modelizar gráficas de supervivencia que cubrían únicamente unos pocos ciclos logarítmicos de inactivación. Por ello, estos modelos no son del todo adecuados para describir la inactivación por PEAV en los niveles de interés para la aplicación industrial de esta tecnología.

A lo largo de los últimos 15 años, se ha propuesto el uso de diversas ecuaciones matemáticas para describir las gráficas de supervivencia cóncavas, tanto en los tratamientos de PEAV, como en los tratamientos con otros agentes o tecnologías (Tabla 1.1). Así, se han presentado ecuaciones puramente empíricas (Cole *et al.*, 1993; Peleg y Penchina, 2000) y ecuaciones con cierta base biológica. Dentro de estas últimas, existen ecuaciones basadas en la presencia de dos subpoblaciones de diferente resistencia a los PEAV (Pruitt y Kamau, 1993), así como modelos basados en la

existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana (Augustin *et al.*, 1998; Peleg y Cole, 1998; Mafart *et al.*, 2002; van Boekel, 2002).

Dentro de todos los modelos desarrollados, aquellos que están basados en la distribución de Weibull (Weibull, 1951) han sido utilizados por gran número de autores, debido a su simplicidad y flexibilidad (Álvarez *et al.*, 2006). Estos modelos (Peleg y Cole, 1998; Mafart *et al.*, 2002; van Boekel, 2002) permiten describir gráficas de supervivencia de perfil lineal, cóncavo o convexo, utilizando para ello únicamente dos parámetros, el parámetro de escala (b , δ o α en las ecuaciones de la Tabla 1.1) y el parámetro de forma (n , ρ y β en las ecuaciones de la Tabla 1.1).

El parámetro de forma hace referencia al perfil que presenta la gráfica de supervivencia. Un parámetro de forma inferior a uno corresponde con un perfil cóncavo, superior a uno con un perfil convexo, e igual a uno con una línea recta. En cambio, el significado del parámetro de escala depende de la ecuación matemática. Así, en la ecuación de van Boekel (2002), éste hace referencia al tiempo necesario para inactivar el primer ciclo neperiano de la población microbiana, mientras que en la ecuación de Mafart *et al.* (2002), el parámetro de escala se corresponde con el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico decimal. Hay que apostillar que estos modelos también se pueden utilizar cuando en la gráfica de supervivencia la fracción del número de supervivientes se representa en función de la energía específica. En tal caso, el parámetro de escala cambiaría de unidades, haciendo referencia a la energía específica necesaria para reducir el primer ciclo, neperiano o decimal según fuese el modelo.

1.1.4.2.2. Modelos secundarios

En los estudios de la cinética de inactivación microbiana por PEAV, con objeto de poder comparar la resistencia microbiana en un amplio rango de condiciones experimentales, es habitual estudiar las relaciones matemáticas entre los parámetros del modelo primario con diversas variables investigadas, como la intensidad del campo eléctrico, el pH del medio de tratamiento o incluso el tiempo de almacenamiento en refrigeración de los microorganismos tras el tratamiento (Álvarez *et al.*, 2003d; Gómez *et al.*, 2005a,b; García *et al.*, 2009). Las ecuaciones utilizadas para este propósito se denominan modelos secundarios.

Tabla 1.1: Ecuaciones matemáticas utilizadas por diferentes autores para describir la cinética de inactivación microbiana mediante PEAV. Adaptado de Álvarez *et al.* (2006).

<i>Modelo</i>	<i>Ecuación matemática</i>	<i>Referencia</i>
Cole <i>et al.</i> (1993) ^a	$\text{Log}_{10} S(t) = \frac{\alpha + (\omega - \alpha)}{1 + e^{4\sigma(\tau - \log_{10} t) / \omega - \alpha}}$	Raso <i>et al.</i> (2000)
Peleg y Pechina (2000) ^b	$\text{Log}_{10} S(t) = -a \ln(1 + ct)$	Álvarez <i>et al.</i> (2003e)
Pruitt y Kamau (1993) ^c	$S(t) = pe^{-k_1 t} + (1 - p)e^{-k_2 t}$	Álvarez <i>et al.</i> (2003e)
Augustin <i>et al.</i> (1998) ^d	$S(t) = \left(1 + e^{(t-m)/s^2}\right)^{-1}$	Álvarez <i>et al.</i> (2003e)
Peleg y Cole (1998) ^e	$\text{Log}_{10} S(t) = -bt^n$	Rodrigo <i>et al.</i> (2003)
Mafart <i>et al.</i> (2002) ^f	$\text{Log}_{10} S(t) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^\rho$	Gómez <i>et al.</i> (2005b)
van Boekel (2002) ^g	$\text{Log}_{10} S(t) = -\left(\frac{1}{2,303}\right)\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta$	Álvarez <i>et al.</i> (2003e)

a; α : valor asintótico superior ($\log_{10} S(t)$); ω : valor asintótico inferior ($\log_{10} S(t)$); σ : máxima pendiente de la curva; τ : \log_{10} del tiempo al que se alcanza la máxima pendiente; t : tiempo (μs); S : fracción de supervivientes.
b; a y c: constantes del modelo; t : tiempo de tratamiento (μs); S : fracción de supervivientes.
c; P : fracción de supervivientes de la subpoblación 1; k_1 : velocidad de inactivación de la subpoblación 1; k_2 : velocidad de inactivación de la subpoblación 2; t : tiempo (μs); S : fracción de supervivientes.
d; m: \log_{10} del tiempo para inactivar el 50% de la población (μs); s parámetro proporcional a la desviación estandar de la resistencia ($\mu\text{s}^{0.5}$); t : \log_{10} del tiempo (μs); S : fracción de supervivientes.
e; b : parámetro de escala; n : parámetro de forma; t : tiempo (μs); S : fracción de supervivientes.
f; δ : parámetro de escala; ρ : parámetro de forma; t : tiempo (μs); S : fracción de supervivientes.
g; α : parámetro de escala; β : parámetro de forma; t : tiempo (μs); S : fracción de supervivientes.

En el caso de los modelos primarios basados en la distribución de Weibull, en muchas ocasiones el parámetro de forma es independiente de la intensidad del campo eléctrico para un mismo microorganismo. En este caso, se reajusta el modelo a las curvas de supervivencia iniciales, utilizando como parámetro de forma el valor medio obtenido para los distintos tratamientos. Con ello, se consigue simplificar el modelo basado en la distribución de Weibull, ya que la ecuación queda definida por el parámetro de escala, debido a que el parámetro de forma es constante para todos los tratamientos (Mafart *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2003d, 2003e; Monfort *et al.*, 2010a,b). Para caracterizar la resistencia microbiana a los PEAV, en estos casos y de manera análoga a los tratamientos térmicos, Álvarez *et al.* (2003d) propusieron el uso, junto con el valor de escala medio, del valor Z_{PEAV} . Éste se define como el incremento

en la intensidad del campo eléctrico necesario para disminuir el parámetro de escala un ciclo logarítmico. Sin embargo, la relación entre el valor de escala y el campo eléctrico no siempre es lineal, por lo que el uso del parámetro Z_{PEAV} no puede generalizarse.

Lo ideal sería que estos modelos secundarios estuvieran fundamentados en bases biológicas, fueran simples y permitieran a su vez un estudio detallado de la influencia de las variables en los parámetros del modelo primario. No obstante, es posible encontrar relaciones entre los parámetros y las variables estudiadas de diversa naturaleza (lineales, sigmoideas, polinomiales, etc.). Debido a la variedad de estas relaciones, se suelen utilizar ecuaciones matemáticas empíricas más o menos complejas, que permiten describir adecuadamente las relaciones obtenidas. Por ejemplo, Gómez *et al.* (2005a,b), utilizaron como modelo secundario para describir la relación entre el pH del medio de tratamiento y el parámetro de forma (ρ), un modelo empírico con cuatro parámetros basado en la ecuación de Gompertz (Gompertz, 1825):

(Ec. 1.11)

$$\rho = A + C \cdot e^{-e^{-B(\text{pH}-M)}}$$

donde A , B , C y M son parámetros del modelo. En otras ocasiones, cuando se pretende estudiar la influencia de varias variables a la vez en los parámetros del modelo primario, lo más habitual es utilizar métodos de regresión múltiple, que permiten evaluar no solo la influencia de las variables individuales, sino también de sus interacciones (Gómez *et al.*, 2005a, b).

1.1.4.2.3. Modelos terciarios

La inclusión de los modelos secundarios en la expresión del modelo primario permite obtener los correspondientes modelos terciarios o finales. Una vez que se ha obtenido esta expresión final, el modelo debe ser validado con nuevos datos experimentales, utilizando para ello condiciones diferentes. Esto proporciona información de la bondad del ajuste y, si éste no es adecuado, en qué rango de condiciones se deben obtener datos adicionales para mejorar la precisión del modelo (Whiting, 1995).

Para la validación del modelo final se calculan distintos parámetros estadísticos que informan sobre la precisión predictiva del mismo. Algunos de ellos son el coeficiente de determinación R^2 , el coeficiente de determinación ajustado, $Adj-R^2$, el error cuadrático medio $RECM$, el factor de precisión, Af , y el factor de sesgo, Bf . El significado y las expresiones matemáticas de estos parámetros estadísticos se muestran más adelante en el apartado 3.5, Tratamiento estadístico de los datos, de la sección *Material y Métodos*. Otras representaciones gráficas, como la de los valores obtenidos experimentalmente frente a los estimados por el modelo, son de gran utilidad para comprobar que existe una correspondencia adecuada entre los valores estimados y la respuesta real.

Con los modelos terciarios, es posible predecir la inactivación microbiana en función del tratamiento de PEAV aplicado (campo eléctrico, tiempo de tratamiento o energía aplicada) y de las variables medioambientales estudiadas (pH, actividad de agua, presencia de antimicrobianos, etc.) o, al contrario, determinar las condiciones de tratamiento para obtener un determinado nivel de inactivación en la población microbiana (Gómez *et al.*, 2005a, b). Por ello, la utilización de modelos matemáticos es una herramienta básica, no sólo para estudiar la cinética de inactivación de los microorganismos, sino también desde un punto de vista práctico, en las futuras aplicaciones industriales de la tecnología de los PEAV para el diseño de procesos que, además de garantizar la seguridad de los alimentos, sean eficientes desde el punto de vista energético (Álvarez *et al.*, 2003d).

Sin embargo, estos modelos no deben considerarse como sustitutos de los estudios experimentales, ni del asesoramiento de microbiólogos experimentados. Deben considerarse como una herramienta complementaria ya que la planificación de estrategias apoyadas en el uso de modelos predictivos puede ayudar a solucionar problemas y realizar predicciones y análisis con mayor facilidad.

1.1.4.3 inactivación microbiana por PEAV en sistemas de flujo continuo

La mayoría de estudios cinéticos sobre la inactivación microbiana mediante PEAV se han realizado utilizando cámaras de tratamiento estáticas. El uso de estas cámaras permite controlar con mayor precisión los factores que afectan a la resistencia microbiana, que cuando se aplican tratamientos en flujo continuo. Los estudios de inactivación mediante PEAV llevados a cabo en cámaras de tratamiento en flujo continuo simulan más fielmente un proceso industrial, por lo que los resultados extraídos de ellos son de gran utilidad desde el punto de vista de la aplicación práctica de la tecnología. El principal inconveniente del uso de cámaras de tratamiento en flujo continuo es la falta de uniformidad del tratamiento, lo que dificulta la evaluación del efecto de estos tratamientos en la inactivación microbiana. La distribución del campo eléctrico no es totalmente homogénea, y depende de la geometría de la cámara, como ya se ha descrito en el apartado de Cámaras de tratamiento (1.1.3.2.2). Por otro lado, la uniformidad del tratamiento está influenciada por el propio flujo y por la distribución de temperaturas que se producen en la zona de tratamiento, ya que ésta no es constante en todo el volumen de la cámara. Todo ello, junto con los numerosos factores que influyen en la inactivación microbiana por PEAV, y las diferencias en las condiciones experimentales y características de los equipos utilizados, dificulta enormemente la comparación de los estudios publicados sobre la inactivación mediante PEAV en flujo continuo.

Por ello y por los numerosos factores que influyen en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje, junto con las grandes diferencias en las condiciones de tratamiento y en las características de los equipos utilizados, es difícil comparar los distintos estudios existentes de inactivación mediante PEAV en flujo continuo.

En este apartado se tratará de comparar los resultados que aparecen en la literatura obtenidos en condiciones de tratamiento en flujo continuo, en función de los distintos parámetros de procesado investigados (Tabla 1.2), con el fin de extraer algunas conclusiones generales sobre la inactivación microbiana por PEAV en tratamientos en flujo continuo.

Tabla 1.2. Efectos de los PEAV en diversos microorganismos en tratamientos en flujo continuo.

Microorganismo	Medio de Tratamiento	Logio de reducción	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo de tratamiento (μ s)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Otros parámetros	Referencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Zumo de sandía	3,77	35	2,000	39	4 μ s anchura de pulso, 8 cámaras colineales en serie, 6L/h, 7540 kJ/kg.	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> , 2007b.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche entera	4	30	600	50	1,5 μ s anchura de pulso, 1700 Hz, 25,2 L/h, cámara colineal.	Reina <i>et al.</i> , 1998.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche desnatada	2,5	30	600	25	1,5 μ s anchura de pulso, 1700 Hz, 25,2 L/h, cámara colineal.	Reina <i>et al.</i> , 1998.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche 2% grasa	2,5	30	600	25	1,5 μ s anchura de pulso, 1700 Hz, 25,2 L/h, cámara colineal.	Reina <i>et al.</i> , 1998.
<i>Listeria innocua</i>	Leche desnatada	2,5	50	64	36	2 μ s anchura de pulso, 3,5 Hz, cámara coaxial.	Calderón-Miranda, <i>et al.</i> , 1999a.
<i>Listeria innocua</i>	Tampón citrato-fosfato pH 7	1,5-2,0	29	60	44	3,5-4,8 μ s anchura de pulso, cámara coaxial, 36 L/h, 1000-2700 kJ/kg.	Sepúlveda <i>et al.</i> , 2006.
<i>Listeria innocua</i>	Tampón citrato-fosfato pH 7	3,5	35	60	65	Pulsos caída exponencial (2 μ s), 5-25 pulsos, cámara coaxial, 72 L/h, 200 kJ/kg	San Martín <i>et al.</i> , 2007.
<i>Listeria innocua</i>	Tampón fosfato pH 5	3	28	12	52	2-3,9 μ s anchura de pulso, cámara coaxial.	Wouters <i>et al.</i> , 1999.
<i>Listeria innocua</i>	Huevo	3,5	50	64	36		Calderón-Miranda <i>et al.</i> , 1999b.

Tabla 1.2: Continuación.

Microorganismo	Medio de Tratamiento	Log ₁₀ de reducción	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo de tratamiento (μs)	Temperatura (°C)	Otros parámetros	Referencia
<i>Listeria innocua</i>	Zumo de manzana	4,3	34	7,68	64	40 kJ/kg, 8 Hz, 3 L/h, pulsos de caída exponencial, cámara de electrodos paralelos.	Heinz <i>et al.</i> , 2003.
<i>Listeria innocua</i>	Zumo de naranja	5	30	12	54	Pulsos de caída exponencial, cámara coaxial.	McDonald <i>et al.</i> , 2000.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leche desnatada	3,7	35	450	40	3,7 μs anchura de pulso, pulsos bipolares, cámara colineal, 6 cámaras colineales en serie.	Evréndilek <i>et al.</i> , 2004a.
<i>Staphylococcus aureus</i>	SLUF ^a	5,5	60	1600	40	Pulsos de caída exponencial, 4 pases de 10 pulsos (10 minutos entre cada pase), cámara coaxial refrigerada.	Qin <i>et al.</i> , 1998.
<i>Lactobacillus brevis</i>	Zumo de naranja	5,8	35	1,000	36	4 μs anchura de pulso, 5200 kJ/kg, 8 cámaras colineales en serie.	Elez-Martínez <i>et al.</i> , 2005.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Batido de leche y zumo de naranja	2,5	40	700	55	2,5 μs anchura de pulso, 6 cámaras colineales en serie refrigeradas entre cámaras, 3,6 L/h, 356 Hz	Sampedro <i>et al.</i> , 2007.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Zumo de naranja-zanahoria	2,5	35,8	46,3	-		Rodrigo <i>et al.</i> , 2001.

^a SLUF: simulado de leche ultrafiltrada

Tabla 1.2: Continuación.

Microorganismo	Medio de Tratamiento	Log ₁₀ de reducción	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo de tratamiento (μs)	Temperatura (°C)	Otros parámetros	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cerveza	4,3	41	175	13,5	Temperatura inicial 4°C, 4 μs anchura de pulso, 3,6 L/h, pulsos bipolares, 6 cámaras colineales en serie refrigeradas.	Evréndiek <i>et al.</i> , 2004b.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	SLUF ^a	4-5	16	8000-12000	30	Pulsos de caída exponencial.	Pothakamury <i>et al.</i> , 1995.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Zumo de naranja	5	30	16	60	Pulsos de caída exponencial, cámara coaxial.	McDonald <i>et al.</i> , 2000.
<i>E. coli</i> ATCC 11229	Huevo líquido	6	26	400	37	4 μs anchura de pulso, 100 pulsos, 30 L/h, cámara coaxial.	Martín-Belloso <i>et al.</i> , 1997b.
<i>E. coli</i>	Yema de huevo líquida	2,3	20	210	30	Pulsos bipolares, 2 μs anchura de pulso, 2 Hz, cámara de electrodos paralelos.	Amiali <i>et al.</i> , 2007.
<i>E. coli</i>	Zumo de sandía	4	35	2000	39	4 μs anchura de pulso, 8 cámaras colineales en serie, 6 L/h, 7540 kJ/kg.	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> , 2007b.
<i>E. coli</i>	SLUF ^a	3,5	60	400	40	Pulsos de caída exponencial, cámara coaxial refrigerada.	Qin <i>et al.</i> , 1998.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	SLUF ^a	5,8	37,2	880	38	1,7 μs anchura de pulso, pulsos bipolares, 4 cámaras de campo convergente, 9 L/h, refrigeración tras el tratamiento.	Alkhafaji y Farid, 2007.

^a SLUF: simulado de leche ultrafiltrada

Tabla 1.2: Continuación.

Microorganismo	Medio de Tratamiento	Log ₁₀ de reducción	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo de tratamiento (μs)	Temperatura (°C)	Otros parámetros	Referencia
<i>E. coli</i> O157:H7	Leche desnatada	1,3-2,0	24	141	30	2,8 μs anchura de pulso, 6 cámaras colineales en serie, 3,6 L/h, 550 kJ/kg.	Evrendilek y Zhang, 2005.
<i>E. coli</i>	Zumo de manzana	5	29	115	25	4 μs anchura de pulso, pulsos bipolares.	Evrendilek <i>et al.</i> , 1999.
<i>E. coli</i> O157:H7	Zumo de manzana	2,6	31	202	29	4 μs anchura de pulso, 6 cámaras colineales en serie, 3,6 L/h, 705 kJ/kg.	Evrendilek y Zhang, 2005.
<i>E. coli</i> K12 DH5α	Zumo de manzana	6,2	34	7,68	64	40 kJ/kg, 8Hz, 3 L/h, pulsos de caída exponencial, cámara de electrodos paralelos.	Heinz <i>et al.</i> , 2003.
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Leche desnatada	1,2	47	30	62	0,5 μs anchura de pulso, cámara coaxial, 60 Hz, 5 L/h, 30-90 kJ/kg.	Floury <i>et al.</i> , 2006.
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Yema de huevo líquida	2,5	20	210	30	Pulsos bipolares, 2 μs anchura de pulso, 2 Hz, cámara de electrodos paralelos.	Amiali <i>et al.</i> , 2007.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Leche desnatada	5	31	20	55	2 μs anchura de pulso, 4 cámaras colineales en serie, refrigeradas tras el tratamiento, 0,6 L/h, 140 kJ/kg.	Craven <i>et al.</i> , 2008.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Leche desnatada cruda	2,1-5,9	28-37	20	60	2 μs anchura de pulso, 4 cámaras colineales en serie, 9 L/h, 200 Hz, 140 kJ/kg.	Shamshi <i>et al.</i> , 2008.

Tabla 1.2. Continuación.

Microorganismo	Medio de Tratamiento	Log ₁₀ de reducción	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo de tratamiento (μs)	Temperatura (°C)	Otros parámetros	Referencia
Aerobios mesófilos	Zumo de naranja fresco	4,2	29,5	60	-	1,46 μs anchura de pulso, 800 Hz, 75 L/h, cámaras colineales en serie.	Qiu <i>et al.</i> , 1998
Aerobios mesófilos	Zumo de arándanos	3,8	40	150	25	2 μs anchura de pulso, 1000 Hz, 1,44 L/h, 4 cámaras colineales en serie refrigeradas tras el tratamiento.	Jin y Zhang, 1999
Aerobios mesófilos	Yakju (licor de arroz)	1,2	50	250	-	7 cámaras de tratamiento (0,025 mL) en serie, 2 pases.	Mok y Lee, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zumo de manzana	7	25	2	30	Pulsos de caída exponencial.	Qin <i>et al.</i> , 1995a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zumo de manzana	6,3	50	5	30	Pulsos de caída exponencial, cámara coaxial.	Qin <i>et al.</i> , 1995b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zumo de manzana	3,8	28	100	30	2 μs anchura de pulso, pulsos bipolares de onda cuadrada, 6 cámaras refrigeradas.	Cserhalmi <i>et al.</i> , 2002
Ascosporas de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Zumo de naranja fresco	4,2	29,5	60	-	1,46 μs anchura de pulso, 800 Hz, 75 L/h, cámaras colineales múltiples.	Qiu <i>et al.</i> , 1998.
Mohos y levaduras	Zumo de arándanos	3,8	40	150	25	2 μs anchura de pulso, 1000 Hz, 1,44 L/h, 4 cámaras colineales en serie refrigeradas.	Jin y Zhang, 1999.
Mohos y levaduras	Yakju (licor de arroz)	1,3	50	250	-	7 cámaras colineales (0,025 mL) en serie, 2 pases.	Mok y Lee, 2000.

1.1.4.3.1. Intensidad del campo eléctrico

La mayoría de estudios de inactivación microbiana mediante PEAV en flujo continuo se han llevado a cabo a intensidades de campo eléctrico comprendidas entre 25 y 50 kV/cm, alcanzándose niveles de inactivación de entre 2 y 6 ciclos logarítmicos independientemente del microorganismo investigado. En un principio, cabría esperar que aquellos tratamientos en los que se aplica una mayor intensidad de campo eléctrico fuesen más eficaces. Sin embargo, es difícil obtener esta conclusión cuando se comparan los resultados obtenidos por distintos autores debido a que las diferentes experiencias se han llevado a cabo con distintos microorganismos o distintas cepas del mismo microorganismo, en diferentes medios de tratamientos y utilizando distintas cámaras de tratamientos. Por ejemplo, Martín-Belloso *et al.*, (1997) obtuvieron una reducción de 6 ciclos logarítmicos en la población de *E. coli* suspendida en huevo líquido, aplicando tratamientos de PEAV de 26 kV/cm y 400 μ s utilizando una cámara de tratamiento coaxial, sin embargo Mosqueda-Melgar *et al.*, (2007), en ensayos en zumo de sandía, consiguieron una inactivación de 4 ciclos logarítmicos en el mismo microorganismo, aplicando tratamientos de mayor intensidad de campo eléctrico (35 kV/cm), y mayor tiempo de tratamiento (2000 μ s) utilizando varias cámaras de tratamiento colineales dispuestas en serie. En ambos casos, la temperatura se mantuvo por debajo de los 40°C.

Como se muestra en la Tabla 1.2, en algunos estudios se han aplicado intensidades de campo eléctrico por encima de 40 kV/cm (Calderón-Miranda *et al.*, 1999a, b; Qin *et al.*, 1995b, 1998; Mok y Lee, 2000; Evrendilek *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2007). Estos valores tan elevados de intensidad del campo eléctrico, en algunos casos podrían ser debidos a que los autores, en lugar de calcular el campo eléctrico aplicado a partir de la medida directa de la diferencia de potencial con una sonda de alto voltaje colocada en las proximidades de la cámara de tratamiento, lo calculasen a partir de la diferencia de potencial seleccionada en el equipo. Generalmente, el voltaje seleccionado es mayor que el que realmente se aplica en la cámara de tratamiento. En cualquier caso intensidades tan elevadas resultan inviables desde el punto de vista de la aplicación industrial de la tecnología debido al riesgo de una ruptura dieléctrica en el producto y a que se requieren generadores de PEAV de mucha potencia para aplicar estos tratamientos.

1.1.4.3.2. Tiempo de tratamiento

Como se muestra en la Tabla 1.2, generalmente cuando se aplican tratamientos de una intensidad de campo eléctrico en el rango comprendido entre 35 y 50 kV/cm, se utiliza una única cámara de tratamiento y los tiempos de tratamiento no suelen superar los 100 μ s (Calderón-Miranda *et al.*, 1999a; Heinz *et al.*, 2003; San Martín *et al.*, 2007). Este tiempo de tratamiento se aplica haciendo pasar el producto por esta cámara una o varias veces. Sin embargo, cuando las intensidades de campo eléctrico aplicadas son inferiores a 35 kV/cm, se utilizan tiempos de tratamiento mucho más prolongados. (Martín-Belloso *et al.*, 1997b; Reina *et al.*, 1998; Amiali *et al.*, 2007). Generalmente, la aplicación de estos tiempos de tratamiento tan prolongados requiere del uso de varias cámaras de tratamiento en serie con intercambiadores de calor entre ellas (Evrendilek *et al.*, 2004a,b; Alkhafaji y Farid, 2007; Sampedro *et al.*, 2007). Estos intercambiadores refrigeran el producto que sale de una cámara antes de entrar en la siguiente, con objeto de evitar que se alcancen temperaturas muy elevadas que, además de inactivar a los microorganismos, podrían afectar a los parámetros de calidad de los alimentos. La utilización de la configuración de cámaras conectadas en serie con sistemas de refrigeración entre ellas parece poco viable industrialmente no solo por el coste energético de tratamientos tan prolongados sino por el incremento del coste energético que supone el sistema de refrigeración.

En cuanto a la cinética de inactivación microbiana en los tratamientos por PEAV en continuo, generalmente se obtiene una relación lineal entre el logaritmo del número de supervivientes y el tiempo de tratamiento (Martín-Belloso *et al.*, 1997b; Evrendilek *et al.*, 2004; San Martín *et al.*, 2007). Sin embargo, estas gráficas de supervivencia no pueden compararse con las que se obtienen en los tratamientos a escala de laboratorio en cámaras estáticas. En los tratamientos en flujo continuo, un tratamiento más prolongado implica la aplicación de un mayor número de pulsos al producto que atraviesa la cámara de tratamiento y, por lo tanto, un mayor aporte energético y un mayor incremento de su temperatura. Como se ha indicado anteriormente, el tiempo de residencia del producto en la cámara de tratamiento en los procesos en continuo es tan corto que toda la energía eléctrica aplicada contribuye al incremento de la temperatura del medio de tratamiento. Por lo tanto, la obtención de estas gráficas de supervivencia lineales, diferentes a las obtenidas en los tratamientos en estático, podría ser debida al

aumento de la eficacia del proceso en los tratamientos más prolongados, debido a que estos tratamientos se aplican a mayores temperaturas.

1.1.4.3.3. Temperatura de tratamiento

Resulta difícil obtener conclusiones sólidas sobre efecto de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV, dado que en los estudios existentes en la bibliografía en ocasiones no se indica este parámetro con precisión o, cuando se indica, las temperaturas utilizadas en diferentes investigaciones son distintas. Además, apenas existen estudios sistemáticos a cerca del efecto de este parámetro en la inactivación microbiana. De los pocos estudios existentes, se puede concluir que, aunque no se alcancen temperaturas letales para los microorganismos, al aumentar la temperatura inicial del producto, aumenta la eficacia letal del tratamiento de PEAV. Por ejemplo, Amiali *et al.* (2007) observaron que la inactivación obtenida en *E. coli* O157:H7 suspendido en yema de huevo tras aplicar un tratamiento de PEAV (20 kV/cm, 210 μ s) fue de 1,9, 2,3 y 4,9 ciclos logarítmicos cuando las temperaturas de entrada del producto a la cámara de tratamiento fueron 20, 30 y 40°C, respectivamente. Cuando el microorganismo tratado fue *Salmonella* Enteritidis, los resultados mostraron la misma tendencia. El aumento de la temperatura inicial del producto disminuyó el tiempo y la energía necesarios para alcanzar un determinado nivel de inactivación (Sampedro *et al.*, 2007). Heinz *et al.* (2003) también estudiaron el efecto de la temperatura inicial del medio de tratamiento sobre la resistencia microbiana a los PEAV. En sus estudios observaron que, el aumento de la temperatura del producto entre 35 y 70°C, incrementaba la eficiencia del proceso. Por ejemplo, un tratamiento de PEAV de una intensidad de campo eléctrico de 36 kV/cm a 35°C requirió un aporte energético de 60 kJ/kg para lograr un nivel de inactivación de 3 ciclos logarítmicos de *E. coli* suspendido en zumo de manzana, mientras que a una temperatura inicial de 65°C, tan solo fue necesario aplicar 5 kJ/kg. Sin embargo, dadas las altas temperaturas utilizadas en estos estudios, no queda claro si los niveles de inactivación obtenidos se deben al efecto combinado de los PEAV y el calor, o bien se debe a que, en ocasiones, las temperaturas de salida eran letales por sí mismas sobre los microorganismos investigados.

En la mayoría de los estudios en los que se indica la temperatura de salida del producto, ésta se determina mediante un termopar colocado a la salida de la cámara de tratamiento. Recientemente, el uso de técnicas de simulación numérica ha demostrado que en algunos puntos de la zona de tratamiento podrían alcanzarse temperaturas más elevadas que las medidas con el termopar colocado en el exterior (Jaeger *et al.*, 2009a). Estas temperaturas deberían considerarse a la hora de evaluar el efecto letal de los tratamientos y valorar si podrían afectar a las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos procesados por PEAV.

Con el fin de que no se alcancen temperaturas muy elevadas en los alimentos procesados por PEAV cuando se requieren tiempos de tratamiento prolongados, algunos autores han propuesto el uso de varias cámaras en serie acompañado generalmente con la colocación de intercambiadores de calor entre ellas para disminuir la temperatura del producto (Qin *et al.*, 1998; Mok y Lee, 2000; Sampedro *et al.*, 2006; Alkhafaji y Farid, 2007; Craven *et al.*, 2008; Shamshi *et al.*, 2008). Sin embargo, esta configuración, además de suponer un aumento en el coste energético del proceso, podría enmascarar la influencia de la temperatura sobre el efecto letal total del tratamiento de PEAV. Cuando se trabaja con esta configuración se suele indicar la temperatura de salida del producto tras haber circulado por las distintas cámaras de tratamiento y los correspondientes intercambiadores de calor. Por lo tanto, no está claro si en las distintas cámaras de tratamiento antes del enfriamiento se alcanzan temperaturas elevadas que puedan contribuir al efecto letal del tratamiento aplicado.

Por ejemplo, Elez-Martínez *et al.* (2005) aplicaron un tratamiento de PEAV (35 kV/cm, 1000 μ s) a una suspensión de *Lactobacillus brevis* en zumo de naranja mediante 8 cámaras de tratamiento colineales en serie, sin exceder los 36°C. La energía aplicada con este tratamiento fue de 5200 kJ/kg, lo que supondría un hipotético aumento de la temperatura del producto de aproximadamente 1250°C, de no disponer de un sistema de refrigeración entre las 8 cámaras de tratamiento conectadas en serie. El elevado aporte energético sugiere que la temperatura del producto dentro de cada cámara pudiera haber alcanzado unos niveles muy elevados antes de ser refrigerado, contribuyendo al efecto letal del tratamiento. Además, desde un punto de vista práctico, el tratamiento resulta inviable, ya que al alto coste energético que supone el tratamiento en sí, se suma el coste energético derivado de la refrigeración del producto en los intercambiadores de calor instalados entre las cámaras.

1.1.4.3.4. Medio de tratamiento

Como se puede observar en la Tabla 1.2, la mayoría de los estudios sobre la inactivación microbiana por PEAV en flujo continuo se han llevado a cabo en matrices alimentarias reales, tales como zumos de frutas (McDonald *et al.*, 2000; Heinz *et al.*, 2003; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2007), leche (Reina *et al.*, 1998; Calderón-Miranda *et al.*, 1999a; Evrendilek y Zhang, 2005; Flourey *et al.*, 2006), huevo líquido (Calderón-Miranda *et al.*, 1999b; Amiali *et al.*, 2007), o incluso bebidas alcohólicas, como cerveza (Evrendilek *et al.*, 2004b) o yakju (licor de arroz) (Mok y Lee, 2000). Como ya se ha comentado en el apartado 1.1.4.1.3 (Características del medio de tratamiento), el medio de tratamiento es uno de los factores más importantes a tener en cuenta en el proceso de aplicación de los PEAV. Las características fisicoquímicas del medio condicionan en gran medida la resistencia microbiana a esta tecnología.

Con objeto de ilustrar la influencia de las características del medio de tratamiento en la resistencia de los microorganismos a los PEAV, se muestran como ejemplo las investigaciones sobre *L. plantarum* de Sampedro *et al.* (2007) y Evrendilek *et al.* (2004b). Sampedro *et al.* (2007) obtuvieron 2,5 ciclos logarítmicos de inactivación de este microorganismo inoculado en batido de leche con zumo de naranja, tras aplicar un tratamiento de PEAV de 40 kV/cm de intensidad de campo eléctrico y 130 μ s de duración, mientras que Evrendilek *et al.* (2004b) lograron una reducción de 4,3 ciclos logarítmicos con un tratamiento de 41 kV/cm y 175 μ s en el mismo microorganismo suspendido en cerveza. La mayor inactivación observada en las investigaciones de Evrendilek *et al.* (2004b) pudo ser debida casi con toda seguridad a las evidentes diferencias en la composición de los medios de tratamiento. Otros ejemplos de la influencia del medio de tratamiento en la resistencia microbiana a los PEAV son las investigaciones de Wouters *et al.* (1999) y McDonald *et al.* (2000) sobre *Listeria innocua*. Tras la aplicación de tratamientos de PEAV de 28 kV/cm y 12 μ s, y 30 kV/cm y 12 μ s, a *L. innocua* suspendido en tampón de pH 5,0 y zumo de naranja, respectivamente, observaron una reducción de 3,0 y 5,0 ciclos logarítmicos en la concentración de este microorganismo. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de considerar la composición del medio de tratamiento al estudiar la eficacia letal de un proceso de PEAV.

La influencia del medio de tratamiento en la resistencia microbiana a los PEAV obliga a que, antes de definir las condiciones de tratamiento necesarias para garantizar la seguridad de un alimento, los resultados obtenidos en medios modelos tendrán que ser validados con los microorganismos de interés en los propios alimentos.

1.1.4.3.5. Tipo de microorganismo

Como se puede observar en la Tabla 1.2, en los estudios realizados en flujo continuo, de entre los microorganismos Gram-positivos, *Listeria innocua* es el más estudiado (Calderón-Miranda *et al.*, 1999a, b; Wouters *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 2000; Heinz *et al.*, 2003; Sepúlveda *et al.*, 2006; San Martín *et al.*, 2007), mientras que de entre los Gram-negativos, lo es *E. coli* (Martín-Belloso *et al.*, 1997b; Qin *et al.*, 1998; Evrendilek *et al.*, 1999; Heinz *et al.*, 2003; Evrendilek y Zhang, 2005; Alkhafaji y Farid, 2007; Amiali *et al.*, 2007; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2007). Los estudios realizados con la propia flora del alimento son escasos (Qiu *et al.*, 1998; Jin y Zhang, 1999; Mok y Lee, 2000). En la mayoría de los casos se ha investigado la resistencia de una población microbiana que se inocula al producto.

La eficacia de un tratamiento de PEAV está condicionada por el tipo de microorganismo utilizado en el estudio, como se ha descrito previamente en el apartado de Características de los microorganismos (1.1.4.1.2). Así, estudios llevados a cabo en condiciones similares de tratamiento podrían mostrar niveles de inactivación diferentes, dependiendo del microorganismo estudiado. Craven *et al.* (2008) lograron inactivar hasta 5 ciclos logarítmicos de la población de *Pseudomonas fluorescens* en leche desnatada aplicando para ello tratamientos de PEAV de intensidades de campo eléctrico de 31 kV/cm, durante 20 μ s. En otros trabajos, también con leche desnatada, pero utilizando como microorganismo esta vez *Staphylococcus aureus*, Evrendilek *et al.* (2004a) obtuvieron una reducción de 3,7 ciclos logarítmicos, incluso aplicando intensidades de campo eléctrico ligeramente superiores (34 kV/cm) y tiempos de tratamiento mucho más prolongados (450 μ s). Esta comparación pone de manifiesto la influencia de las características del microorganismo estudiado sobre la eficacia del tratamiento de PEAV aplicado.

Al igual que ocurre en los tratamientos en cámaras estáticas, existe también variación de la resistencia microbiana a los PEAV entre distintas cepas del mismo microorganismo en los tratamientos en flujo continuo. Por ejemplo, en experiencias distintas en zumo de manzana como medio de tratamiento, con distintas cepas de *E. coli*, Evrendilek *et al.* (1999) y Evrendilek y Zhang (2005) obtuvieron 5 y 2,6 ciclos logarítmicos de inactivación, aplicando intensidades de campo de 29 y 31 kV/cm, y tiempos de tratamiento de 115 y 202 μ s, respectivamente.

1.1.4.3.6. Cámara de tratamiento

La mayoría de los resultados sobre la inactivación microbiana mediante PEAV en flujo continuo, han sido obtenidos en cámaras de tratamiento colineales (Reina *et al.*, 1998; Jin y Zhang, 1999; Mok y Lee, 2000; Evrendilek *et al.*, 2004a,b; Elez-Martínez *et al.*, 2005; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2007) y coaxiales (Calderón-Miranda *et al.*, 1999a; McDonald *et al.*, 2000; Floury *et al.*, 2006; San Martín *et al.*, 2007) (Tabla 1.2). A pesar de presentar una distribución de campo eléctrico más homogénea que las cámaras colineales o las coaxiales, las cámaras de electrodos paralelos han sido generalmente poco utilizadas en los estudios de inactivación microbiana en flujo continuo (Heinz *et al.*, 2003; Amiali *et al.*, 2007). Probablemente, se han preferido las cámaras colineales debido a que su geometría cilíndrica las hace más apropiadas para su instalación en las conducciones tubulares que se utilizan en la industria alimentaria para transportar los alimentos líquidos. Como se ha indicado anteriormente, es posible caracterizar la distribución del campo eléctrico y de la temperatura de tratamiento en estas cámaras mediante el uso de técnicas de simulación numérica (Qiu *et al.*, 1998; Fiala *et al.*, 2001; Lindgren, 2002; Toepfl *et al.*, 2007b; Gerlach *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2009a; Puértolas *et al.*, 2010b,c, 2011). Sin embargo, en la mayoría de los estudios publicados no se han utilizado estas técnicas para mostrar la distribución del campo eléctrico y la temperatura en la cámara de tratamiento (Jin y Zhang, 1995; Elez-Martínez *et al.*, 2005; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2007) y se calcula la intensidad del campo eléctrico como si se tratara de una cámara de tratamiento de electrodos paralelos. La falta de una definición adecuada de la intensidad de campo eléctrico aplicado en estos tratamientos contribuye a dificultar la comparación de los resultados obtenidos en distintos estudios.

1.1.4.3.7. Presencia de moléculas con efecto antimicrobiano

De entre todas las moléculas con carácter antimicrobiano que se han utilizado con objeto de aumentar el efecto letal de los PEAV, la nisina y la lisozima son las dos más estudiadas, como se puede observar en la Tabla 1.3. La nisina es una bacteriocina de naturaleza peptídica producida por *Lactococcus lactis* de uso extendido en la industria lechera (Hurst y Hoover, 1993; Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008). Tiene su efecto de acción sobre la membrana citoplasmática de los microorganismos, uniéndose a ella y formando poros (Delves-Broughton, 1990; Hurst y Hoover, 1993). Su espectro de acción se centra en los microorganismos Gram-positivos, incluso en los esporos (Calderón-Miranda, 1999a), aunque también se ha descrito su efecto sobre bacterias Gram-negativas cuando su membrana externa se encuentra dañada (Stevens *et al.*, 1992). Por su parte, la lisozima es una enzima que se encuentra presente de forma natural en el huevo o la leche. Tiene su efecto sobre la pared celular provocando su desestructuración (Russell *et al.*, 2000). Esta molécula es efectiva frente a los microorganismos Gram-positivos, mientras que los Gram-negativos son resistentes salvo que tengan dañada su membrana externa (Masschalck y Michiels, 2003).

Además de la nisina y la lisozima, otras moléculas han sido estudiadas con el fin de aumentar la eficacia de los PEAV, como la pediocina (Kalchayanand *et al.*, 1992), natamicina, ácidos orgánicos, tales como el ácido benzoico o el ácido láctico (McNamee *et al.*, 2010), cítrico, acético o málico (Fernandez-Molina *et al.*, 2001; McNamee *et al.*, 2010), o aceites esenciales, como el aceite de clavo (Ziwei *et al.*, 2005), canela (Iu *et al.*, 2001) o lúpulo (Ulmer *et al.*, 2002). Sin embargo, algunas de estas moléculas aportan sabor, aroma o ambas propiedades al producto, que en algunos casos no sería deseable, y por lo tanto, no serían de utilidad desde un punto de vista práctico, para un espectro amplio de alimentos.

Tabla 1.3: Efectos de los PEAV en flujo continuo en combinación con moléculas con efecto antimicrobiano.

Microorganismo	Antimicrobiano	Concentración	Medio de tratamiento	Tratamiento PEAV	Antimicrobiano ^a	PEAV ^a	Combinación ^a	Referencia
<i>L. timocua</i>	Nisina	100 UI/mL	Leche desnatada	30 (50) kV/cm, 64 µs, 34°C.	0,7	1,9 (2,4)	2,8 (3,8)	Calderón-Miranda <i>et al.</i> , 1999a.
<i>L. timocua</i>	Nisina	100 UI/mL	Huevo líquido	30 (50) kV/cm, 64 µs, 34°C.	0,5	0,5 (3,4)	2,7 (5,5)	Calderón-Miranda <i>et al.</i> , 1999b.
<i>L. timocua</i>	Nisina	2,5 ppm	Zumo de naranja	40 kV/cm, 56°C, 100 µs.	2,1	3,7	5,6	McNamee <i>et al.</i> , 2010.
<i>S. aureus</i>	Nisina	20 UI/mL	Leche desnatada	35 kV/cm, 2400 µs.	0	1,0	6,0	Sobrino-López y Martín-Belloso, 2006.
<i>S. aureus</i>	Nisina + Lisozima	5 UI/mL + 300 UI/mL	Leche desnatada	35 kV/cm, 1200 µs, <25°C	1,6	3,8	5,3	Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008.
<i>L. plantarum</i>	Nisina	10 µg/mL	Cerveza	31.6 kV/cm, 30 kJ/kg, <31°C.	0	2,5	4,5	Ulmer <i>et al.</i> , 2002.
<i>E. coli</i> K12	Nisina	2,5 ppm	Zumo de naranja	40 kV/cm, 56°C, 100 µs.	2,5	6,3	7,9	McNamee <i>et al.</i> , 2010.
<i>E. coli</i>	Nisina	500 UI/mL	SLUF	11.25 kV/cm, 5 pulsos	2,0	2,0	4,0	Terebiznik <i>et al.</i> , 2000.
<i>E. coli</i> O157:H7	Nisina	2% (p/v)	Sidra	80 kV/cm, 20 µs, 42°C.	4,6	5,0	8,0	Iu <i>et al.</i> , 2001.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Nisina + Lisozima	27,5UI/mL + 690 UI/mL	Zumo de naranja sin pulpa	90 kV/cm, 40 µs, 45°C	1,5	1,5	4,0	Liang <i>et al.</i> , 2002.
Flora habitual	Nisina + Lisozima	4 mg/100 g	Sidra de manzana	27 kV/cm, 50°C, 17.6 pulsos onda cuadrada, c. coaxial.	0,02	1,12	1,78	Ziwei <i>et al.</i> , 2005.
Flora habitual	Nisina	100 UI/mL	Zumo de naranja	80 kV/cm, 40-60 µs, 44°C.	0,4	1,4	6,0	Hodgins <i>et al.</i> , 2002.
Flora habitual	Nisina + Lisozima	38 UI + 1638 UI	Leche desnatada	80 kV/cm, 100 µs, 52°C.	1,2	1,3	7,0	Smith <i>et al.</i> , 2002.

^a Ciclos logarítmicos de reducción para cada tratamiento

Según se muestra en la Tabla 1.3, distintos estudios han demostrado que es posible aumentar el efecto letal de los PEAV sobre bacterias Gram-negativas al añadir al medio de tratamiento nisina o lisozima. (Terebiznik *et al.*, 2000; Iu *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2002; McNamee *et al.*, 2010). Estos resultados parecen indicar que el tratamiento de PEAV daña la membrana externa, permitiendo que la nisina y la lisozima accedan a las estructuras de las envolturas celulares donde ejercen su acción. Sin embargo, generalmente, en aquellos estudios donde se ha incrementado la eficacia de los tratamientos de PEAV frente a las bacterias Gram-negativas añadiendo estos antimicrobianos, las temperaturas de tratamiento eran relativamente altas (42-56°C) por lo que parece que el daño sobre la membrana externa está causado por la temperatura más que por el tratamiento de PEAV (Iu *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2002; Hodgins *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; McNamee *et al.*, 2010).

Como se puede observar en los resultados mostrados en la Tabla 1.3, en algunas ocasiones, el efecto de la combinación de los tratamientos de PEAV con la adición de moléculas con efecto antimicrobiano fue aditivo, es decir, la inactivación total obtenida fue la suma de los efectos individuales del antimicrobiano y el tratamiento de PEAV (Terebiznik *et al.*, 2000; Sobino-López y Martín-Belloso, 2008; McNamee *et al.*, 2010). Sin embargo, desde el punto de vista de aplicación práctica, interesa obtener efectos sinérgicos, como los observados por algunos autores (Calderón-Miranda *et al.*, 1999b; Ulmer *et al.*, 2002; Sobrino-López y Martín-Belloso, 2006), en los que el efecto obtenido tras el tratamiento combinado es mayor que la suma de los efectos individuales.

Como se ha indicado, resulta complicado extraer conclusiones concretas de los estudios realizados sobre la inactivación microbiana por PEAV en tratamientos en flujo continuo, debido a los numerosos factores que afectan a la resistencia microbiana a esta tecnología, a la diversidad de condiciones de tratamiento investigada y a las diferencias existentes en los equipos utilizados en distintos laboratorios. Todo ello justifica que, hasta el momento, no se hayan definido con claridad las condiciones de

tratamiento necesarias para conseguir un nivel de inactivación que garantice la seguridad de los alimentos. Resumiendo, las principales limitaciones de los estudios en flujo continuo realizados son:

- La mayoría de los estudios se han realizado utilizando intensidades de campo eléctrico por encima de los 30 kV/cm, llegándose a alcanzar valores de hasta 50 kV/cm. Estos campos eléctricos tan elevados son difíciles de aplicar en la práctica industrial, ya que se requieren generadores de PEAV muy potentes y el riesgo de que se produzca la ruptura dieléctrica del alimento es muy elevado.
- En la mayoría de los casos el tiempo de los tratamientos está por encima de los 100 μ s. Tiempos de tratamiento por encima de este valor requieren el uso de varias cámaras de tratamiento conectadas en serie, con sistemas de refrigeración entre ellas, lo que implica que los procesos supongan un coste energético muy elevado, tanto para aplicar los tratamientos como para refrigerar el producto, con objeto de que no se alcancen temperaturas que puedan dañar a las propiedades sensoriales y nutritivas de los alimentos.
- En la mayoría de las ocasiones, en los artículos científicos publicados no se indican adecuadamente las condiciones de tratamiento. En muchos casos, no se indican datos fundamentales como la temperatura de entrada y salida del producto, la energía específica total aplicada, el pH o la conductividad del medio de tratamiento. Además, generalmente no se utilizan técnicas de simulación numérica para caracterizar la uniformidad del tratamiento.
- Los estudios han sido realizados con distintos microorganismos y cepas, sin justificar la razón por la que se utiliza un microorganismo o una cepa determinados, y no otros. Los estudios deberían de hacerse con las cepas más resistentes a los tratamientos para establecer protocolos de tratamiento eficaces para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos.

1.2. LA PASTEURIZACIÓN

La pasteurización de los alimentos tiene su origen en los trabajos del científico francés Louis Pasteur, quien a mediados del siglo XIX comenzó a realizar una serie de estudios para conocer cuál era la causa de la alteración que se producía en la cerveza y el vino con el paso del tiempo, y que causaba grandes pérdidas económicas a los productores franceses. Pasteur descubrió que los microorganismos estaban implicados en este proceso y demostró que elevando la temperatura de la cerveza y el vino hasta los 44°C durante un breve periodo de tiempo, para no afectar en exceso a las propiedades sensoriales de los productos, se reducía la población de los microorganismos alterantes y se prolongaba su vida útil. Posteriormente, este tipo de tratamientos a temperaturas moderadas durante cortos periodos de tiempo se aplicaron a otros alimentos líquidos como la leche. En la actualidad la pasteurización es un tratamiento que se aplica a multitud de alimentos sólidos y líquidos con objeto de inactivar la flora patógena que puedan vehicular, y de este modo garantiza su seguridad.

El principal objetivo de la pasteurización es garantizar que los alimentos que llegan al consumidor estén libres de flora vegetativa patógena. El tratamiento aplicado, además de inactivar a los microorganismos patógenos, reduce la población de la flora alterante por lo que contribuye a prolongar la vida útil de los alimentos. Para evitar o retrasar el crecimiento de los microorganismos que sobreviven al tratamiento es necesario utilizar otros métodos de conservación como la refrigeración, las atmósferas modificadas, la adición de antimicrobianos o la combinación de todos ellos (Silva y Gibbs, 2010).

Aunque tradicionalmente los tratamientos de pasteurización se han asociado exclusivamente con el calor, el desarrollo de otras tecnologías capaces de inactivar microorganismos en los alimentos ha provocado que, en la actualidad, se consideren otras técnicas para conseguir los objetivos que persigue la pasteurización. De este modo, la pasteurización ha sido recientemente redefinida por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América como “cualquier proceso, tratamiento o combinación que es aplicado a los alimentos para reducir la población del microorganismo más resistente con relevancia en la salud pública, hasta un nivel que

no suponga un riesgo para la salud pública en unas condiciones normales de distribución y almacenamiento” (NACMCF, 2006).

Por tanto, esta definición incluye los procesos no térmicos de pasteurización, como las altas presiones hidrostáticas o los pulsos eléctricos de alto voltaje (NACMCF, 2004; Silva y Gibbs, 2010). Para poder utilizar estas nuevas tecnologías como sistema de pasteurización, es necesario demostrar que con su aplicación se consiguen unos niveles de inactivación, en los microorganismos patógenos que puedan vehicular los alimentos, equivalentes a los que se obtienen con el tratamiento térmico.

1.2.1. Nuevos conceptos de seguridad alimentaria: aplicación para la pasteurización de los alimentos

La definición de un tratamiento de conservación a un alimento requiere establecer unas pautas, de manera que las diferentes industrias puedan aplicar tratamientos equivalentes con el mismo nivel de seguridad alimentaria. La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) hace referencia al *Nivel Tolerable de Riesgo* (NTR), que se podría definir como “el nivel de protección que se considera apropiado por un país estableciendo una medida sanitaria o fitosanitaria para proteger la vida o la salud humana, animal o vegetal en su territorio” (WTO, 1995; Stewart *et al.* 2002). El NTR puede expresarse, por ejemplo, como el número de casos al año provocados por un determinado peligro microbiano por cada 100.000 habitantes de un país. Por ejemplo, en algunos países, el nivel de listeriosis humana se sitúa normalmente en el rango de 0,4 a 0,8 casos por cada 100.000 habitantes cada año (van Schorthost, 1998). Para posibilitar que los responsables de la gestión de riesgos puedan transmitir eficazmente objetivos precisos de seguridad alimentaria a la industria y a las empresas relacionadas con el sector, se definen otros conceptos como los Objetivos de Seguridad Alimentaria o Criterios del Resultado, del Procesado y del Producto que son necesarios considerar en el desarrollo de procesos de pasteurización por nuevas tecnologías de procesado. El objetivo final de estos nuevos conceptos es favorecer el control de los riesgos sanitarios, mediante la conversión de los objetivos de salud pública establecidos por las administraciones, en parámetros que puedan ser manejados con facilidad por las empresas y evaluados adecuadamente por los servicios de inspección.

1.2.1.1. Objetivo de Seguridad Alimentaria

El Objetivo de Seguridad Alimentaria (del inglés *Food Safety Objective*, FSO) se puede definir como la máxima concentración o frecuencia de un peligro, microbiológico en el contexto de ésta Tesis Doctoral, en un alimento que se considera tolerable para la protección del consumidor. Siempre que sea posible, debe ser cuantitativo y verificable (van Schorthost, 1998). La principal finalidad del FSO es traducir un objetivo de salud pública (es decir, un nivel deseable de protección al consumidor) en atributos que se puedan medir para permitir que la industria alimentaria implante medidas de control para los procesos y que permita comparaciones entre países.

Algunos ejemplos de Objetivos de Seguridad Alimentaria podrían ser que el nivel de *Listeria monocytogenes* en platos precocinados no exceda 100 UFC/g en el momento de ser consumido (Smelt *et al.*, 1997), o que el nivel de microorganismos enteropatógenos sea menor a 1 UFC/10 L de zumo de fruta pasteurizado (NACMCF, 2004). Como ya se ha comentado, los FSO deben ser cuantitativos y verificables siempre que sea posible, aunque esta verificación no siempre es posible mediante análisis microbiológicos. Por ejemplo, un FSO posible para alimentos poco ácidos enlatados podría ser que la probabilidad de que haya un esporo de *Clostridium botulinum* sea inferior a 1×10^{-12} por envase, o lo que es lo mismo, encontrar un envase de cada 10^{12} envases con un esporo de *C. botulinum* viable. Verificar esto analizando el producto final sería prácticamente imposible, pero sí podría verificarse analizando los protocolos de procesado, en este caso, comprobando que el producto recibe un tratamiento térmico equivalente a la cocción botulínica. Un FSO debe permitir a las autoridades transmitir claramente lo que se espera de los alimentos gestionados correctamente; sin embargo, no indica cómo debe hacer cada industria para alcanzar ese FSO, lo que ofrece una flexibilidad considerable al procesado. Por ejemplo, si diferentes industrias procesasen zumo de frutas mediante la aplicación de calor, pulsos eléctricos de alto voltaje o radiación ultravioleta, cada industria podría, evidentemente, usar equipos y procesados diferentes y sin embargo cumplir con el mismo FSO, ofreciendo el mismo nivel de seguridad en cada caso. Es decir, cada industria puede utilizar ingredientes o técnicas de procesado diferentes siempre que cumpla con un FSO específico y no incumpla otros.

Mientras que en la mayoría de las enfermedades de origen alimentario se conoce con precisión cuál es el agente responsable, periódicamente aparecen los denominados *microorganismos patógenos emergentes*, causantes de nuevas enfermedades de origen alimentario. Para estos nuevos peligros se puede establecer un FSO provisional como primer paso para comunicar a las industrias alimentarias. Posteriormente, una vez que se haya obtenido más información epidemiológica sobre el peligro, el alimento, las condiciones que provocan la enfermedad y se conozcan las medidas eficaces de control, el FSO provisional podría ser ajustado. En el caso de nuevos productos (los *nuevos productos* son aquellos que no tienen un historial amplio de comercialización y consumo en la Unión Europea desde antes del 15 de mayo de 1997, o alimentos e ingredientes alimentarios para cuya producción se ha utilizado un proceso no frecuente; se rigen por la Regulación (EC) No 258/97), su nivel de seguridad debe equivaler al de productos ya existentes y similares. Antes de su introducción en el mercado, sería necesario establecer un FSO provisional acorde con esta información previa disponible (ICMSF, 2002).

Una vez que se ha alcanzado un acuerdo acerca de qué nivel de riesgo se considera aceptable, y por lo tanto, se ha establecido un Objetivo de Seguridad Alimentaria, la industria y las autoridades responsables deben ajustar su control y los sistemas de inspección para alcanzar ese FSO. Para cumplir con el FSO se deben desarrollar entonces los adecuados criterios del resultado, criterios del proceso y del producto.

Para diseñar unas *medidas de control* del procesado de los alimentos es necesario considerar la resistencia del microorganismo al procesado, el crecimiento posterior de la población resistente al tratamiento y las posibles recontaminaciones tras el procesado y durante el almacenamiento y distribución. Puede ser necesario adoptar una o varias medidas de control en cada uno de los pasos de la cadena. Las medidas de control están encaminadas a *controlar los niveles iniciales* del microorganismo en el alimento (evitar ingredientes en los que se haya detectado un alto nivel de contaminación, prevenir la contaminación cruzada mediante la adopción de Buenas Prácticas Higiénicas), *evitar el incremento* de la población microbiana (evitando su crecimiento, por ejemplo mediante refrigeración, congelación, atmósferas modificadas, etc.) y *reducir la concentración* de microorganismos (mediante la

destrucción de los microorganismos, por ejemplo aplicando un proceso de pasteurización) (ICMSF, 2002).

Las medidas de control adoptadas por la industria se engloban en la adopción de Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) y los planes de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Algunas de estas medidas se pueden expresar como *criterios del resultado* o *criterios del proceso* (van Schorthost, 1998).

1.2.1.2. Criterios del Resultado

El concepto de Criterio del Resultado (del inglés *Performance Criterion*) se puede definir como el resultado de las medidas de control aplicadas a un paso (punto, procedimiento, operación o etapa de la cadena alimentaria completa) o combinación de pasos para lograr el Objetivo de Seguridad Alimentaria (Stewart *et al.*, 2002). Ejemplos de criterios del resultado son:

- Reducción de 12 D (ciclos logarítmicos) de *Clostridium botulinum* en alimentos enlatados poco ácidos (Stumbo, 1973; Brown, 1997).
- Reducción de 6 D de *L. monocytogenes* en alimentos refrigerados listos para el consumo (Smelt *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 1989).
- Reducción de 5 D de la población del microorganismo más resistente relacionado con problemas de salud pública en zumos de fruta (HHS, FDA, 2001).

Mientras que el primer ejemplo es un criterio del resultado para un proceso de esterilización, el segundo y el tercer ejemplos estarían encaminados hacia los procesos de pasteurización. De hecho, y teniendo en cuenta la redefinición de pasteurización, la reducción de 5 ciclos logarítmicos del microorganismo más resistente en un determinado producto podría valer como el criterio de resultado general para cualquier proceso de pasteurización, ya sea por calor, o por alguna nueva tecnología, como los PEAV.

Para establecer los criterios del resultado hay que tener en cuenta el nivel inicial de un peligro y los cambios que puede haber durante la elaboración, distribución, almacenamiento y preparación de un producto. Un criterio del resultado

debe ser menor o igual que el Objetivo de Seguridad Alimentaria, y puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$(Ec. 1.12) \quad H_0 - \Sigma R + \Sigma I \leq FSO$$

donde FSO es el Objetivo de Seguridad Alimentaria; H_0 es el nivel inicial del peligro; ΣR es la reducción total (acumulada) del peligro y ΣI es el incremento total (acumulado) del peligro. FSO , H_0 , ΣR y ΣI se expresan en unidades logarítmicas (van Schorthost, 1998; Stewart *et al.*, 2002).

Para comprender mejor el concepto de criterio del resultado, se ilustra en el siguiente ejemplo un hipotético caso de pasteurización (ICMSF, 2002). La Figura 1.23 muestra una curva hipotética de dosis-respuesta para un determinado patógeno en un producto sometido a pasteurización térmica o un tratamiento equivalente (el ejemplo podría representar una contaminación de *E. coli* O157:H7 en un zumo de frutas). En el ejemplo, el número de casos estimado por cada 100.000 habitantes se incrementa al superar la dosis infectiva de 1 UFC/g. El Objetivo de Seguridad Alimentaria se ha establecido a un nivel 100 veces inferior a este umbral, es decir, menos de 1 UFC/100g en el momento del consumo.

La población inicial (H_0) en el producto sin tratar se estima que podría llegar a 10^3 UFC/g, pero un correcto envasado y almacenamiento tras el tratamiento puede evitar la proliferación del microorganismo ($\Sigma I = 0$). De acuerdo con la ecuación 1.12, anteriormente presentada:

$$3 - \Sigma R + 0 \leq -2$$

$$\Sigma R \leq 5$$

Según los resultados obtenidos tras despejar la ecuación 1.12, el proceso debe asegurar una reducción de 5 D para lograr el FSO del proceso de pasteurización, lo que se corresponde con el criterio del resultado. Esta reducción puede lograrse aplicando una sola medida o combinando varias.

Para establecer adecuadamente los parámetros de la ecuación 1.12, hay que tener en cuenta ciertos aspectos. El nivel inicial del peligro (H_0) no siempre se corresponde con el valor más alto que se encuentre en la bibliografía, lo que podría llevar a estimar un criterio del resultado innecesariamente conservador. H_0 puede variar en función del país o región en la que nos encontremos, de la materia prima para elaborar el producto, etc. Debe por tanto considerarse como el valor inicial más alto que puede esperarse en condiciones normales en una operación determinada.

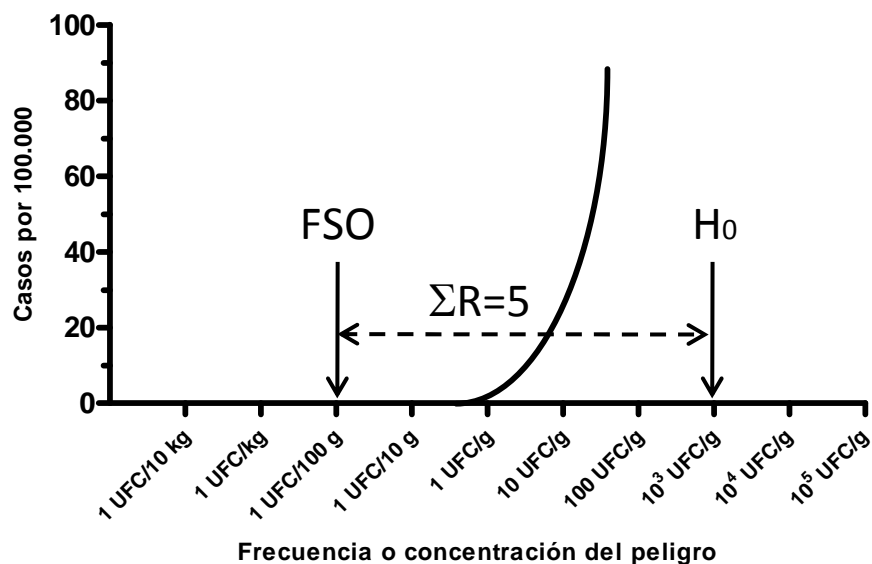


Figura 1.23. Casos hipotéticos de enfermedad causada por la presencia de un agente microbiano a diferentes concentraciones en el alimento, para ilustrar el cálculo de un criterio del resultado (adaptado de ICMSF, 2002). FSO es el Objetivo de Seguridad Alimentaria; H_0 es el nivel inicial del peligro; ΣR es la reducción total del peligro.

El incremento del peligro (ΣI) no solo se debe a la multiplicación del microorganismo en el alimento tras el procesado, sino que hay que considerar también la posibilidad de recontaminación.

En el caso de la reducción del peligro (ΣR), hay que tener en cuenta cualquier reducción, ya sea destrucción por el tratamiento de pasteurización, como separación por filtración, centrifugación o lavado.

1.2.1.3. Criterios del Proceso y del Producto

Para poder alcanzar un criterio del resultado hay que establecer unos parámetros de control (tiempo, temperatura, presión, intensidad del campo eléctrico, energía aplicada, pH, a_w , etc.) en un paso o combinación de pasos. A estos parámetros se les llama Criterios del Proceso (del inglés *Process Criterion*) y Criterios del Producto (del inglés *Product Criterion*). Para comprender mejor estos conceptos, algunos ejemplos de criterios del proceso y del producto son:

- *Criterios del proceso*: 71,7°C (temperatura) durante 15 segundos (tiempo) necesarios para asegurar la inactivación de *Coxiella burnetii* y otros patógenos intestinales no esporulados en leche pasteurizada en Estados Unidos (FDA, 1997).
- *Criterios del proceso*: 500 MPa durante 7,5 minutos para reducir 6 D una población de *L. monocytogenes* en alimentos refrigerados listos para el consumo (Smelt *et al.*, 1997).
- *Criterios del producto*: pH de 4,6 o menor para productos envasados ácidos estables a temperatura ambiente para evitar el desarrollo de *C. botulinum*.

Los criterios del proceso y del producto son conceptos que no necesariamente van separados. Por ejemplo, para productos refrigerados mínimamente procesados se recomiendan tratamientos térmicos de 90°C durante 10 minutos en combinación con otros factores como la disminución del pH o la a_w , para controlar la población microbiana del producto (ACMSF, 1992). En el caso de los PEAV, los estudios realizados hasta la actualidad no han permitido definir ningún criterio del proceso ni del producto para la pasteurización de alimentos por esta tecnología.

Para los procesos de pasteurización térmica, el criterio del proceso vendría definido por tan solo dos factores, la temperatura del tratamiento y el tiempo durante el cual el producto debe mantenerse a esa temperatura, como puede observarse en el primero de los ejemplos anteriores. Para un hipotético proceso de pasteurización por medio de pulsos eléctricos de alto voltaje, el criterio del proceso debería estar definido por varios factores. La intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento se antojan dos factores fundamentales. Sin embargo y como ya se ha descrito con anterioridad, debido a la gran cantidad de factores que tienen influencia sobre la eficacia letal del proceso de PEAV, sería recomendable, incluso necesario, indicar

también otros factores, tales como la energía aplicada o la temperatura inicial y final del producto (Wouters *et al.*, 2001a). De la misma manera, como criterios del producto, el pH o la conductividad eléctrica del alimento serían parámetros a tener en cuenta en un proceso de pasteurización por pulsos eléctricos de alto voltaje.

En determinadas ocasiones en las que no hay datos suficientes para poder establecer un FSO se pueden adoptar *Criterios por Defecto* para ciertas medidas de control. Los desarrollan paneles de expertos y se trata de controlar algún peligro en las peores condiciones, por lo tanto, son criterios menos flexibles (se puede asumir que el nivel inicial de peligro $-H_0-$, o su incremento posterior $-\Sigma I-$, son más elevados de lo normal). Además, los criterios por defecto ofrecen una garantía de seguridad a las empresas alimentarias que no desean o no pueden obtener la información necesaria para establecer unos criterios que puedan ser más adecuados para un proceso o un producto en particular (ICMSF, 2002).

1.2.2. Parámetros científicos requeridos para el establecimiento de métodos alternativos equivalentes de pasteurización

Antes de diseñar correctamente un proceso de pasteurización mediante una nueva tecnología de procesado, se recomienda la realización de los siguientes estudios (NACMCF, 2004):

1. Identificar los microorganismos patógenos que normalmente puede vehicular el alimento que se quiere pasteurizar. De entre los microorganismos patógenos identificados, determinar el más resistente a la nueva tecnología que se quiere utilizar.
2. Establecer el nivel de inactivación que hay que conseguir en el microorganismo patógeno más resistente para garantizar la seguridad del alimento. Este nivel de inactivación depende de la concentración inicial a la que se encuentra habitualmente este microorganismo y de la máxima concentración de ese microorganismo que se considera aceptable desde el punto de vista de la protección de la salud pública (FSO).

3. Determinar las condiciones de tratamiento necesarias para conseguir alcanzar el nivel de inactivación establecido (criterios del proceso, o “process criterion”) en un producto concreto (criterios del producto, o “product criterion”).
4. Validar experimentalmente el proceso propuesto. Para la validación, se recomienda el uso de varias cepas del microorganismo más resistente, en diferentes condiciones de procesado, y en procesos a escala, como mínimo, de planta piloto.
5. Estudiar posibles combinaciones del proceso con otras estrategias de conservación, en caso de que fuese necesario aumentar su eficacia.

Además de realizar estos estudios, sería necesario, para el diseño de un proceso de pasteurización por una nueva tecnología, identificar microorganismos no patógenos con una resistencia al tratamiento similar a la del microorganismo patógeno más resistente. Estos microorganismos se podrían utilizar para validar el proceso en la propia fábrica, donde no es posible utilizar microorganismos patógenos con este objetivo. Otro aspecto importante es el uso de métodos adecuados para la *recuperación y el recuento* de los microorganismos tras el tratamiento, incluidos aquellos que han sido dañados subletalmente y no inactivados, *y el desarrollo de modelos matemáticos* que permitan predecir el comportamiento del microorganismo tras el procesado por la tecnología aplicada (NACMCF, 2004).

Para establecer las condiciones del tratamiento de pasteurización mediante PEAV, inicialmente es necesario identificar los microorganismos patógenos más resistentes en el producto que se pretende tratar. Para identificar estos microorganismos, hay que tener en cuenta varios aspectos, como la resistencia intrínseca de los microorganismos a los PEAV, la concentración inicial probable en el alimento, y la influencia de las características del producto, en la resistencia del microorganismo a los PEAV.

El microorganismo más resistente a una tecnología de conservación no tiene por qué ser necesariamente el más resistente a otros procesos diferentes. Por ejemplo, *Salmonella* Senftenberg 775W, la cual ha demostrado ser muy resistente al calor, es más sensible a los tratamientos por altas presiones hidrostáticas o por pulsos eléctricos

de alto voltaje que otras cepas de *Salmonella* (Metrick *et al.*, 1989; Álvarez *et al.*, 2000). Además, como se ha comentado anteriormente, la resistencia microbiana a los PEAV puede variar considerablemente entre cepas del mismo microorganismo, por lo que este aspecto debería ser seriamente considerado al tratar de identificar el microorganismo más resistente sobre el cual realizar el resto del estudio de pasteurización mediante PEAV.

Respecto a las características del producto, aunque los alimentos ácidos han sido considerados tradicionalmente seguros, debido a que los microorganismos patógenos no son generalmente capaces de crecer en entornos de pH reducido, ha sido demostrado que alimentos no pasteurizados, como los zumos de frutas, pueden ser vehículo de microorganismos patógenos (Duffy y Schaffner, 2001; Bull *et al.*, 2005). La dosis infecciosa tan baja de estos microorganismos, y su capacidad para sobrevivir en medios ácidos, provoca la necesidad de controlar la presencia de posibles microorganismos patógenos en los alimentos ácidos. Dado que la resistencia microbiana a los PEAV puede variar considerablemente dependiendo del pH del medio de tratamiento, los estudios de cribado necesarios para identificar los microorganismos patógenos de interés para la salud humana más resistentes a los PEAV deben realizarse en medios de diversos pH. De acuerdo con los resultados publicados respecto a la resistencia microbiana a los PEAV en medios de diferentes pH, probablemente el microorganismo más resistente para un proceso de pasteurización por PEAV en medio de pH neutro debería ser una cepa de un microorganismo patógeno Gram-positivo, mientras que en productos de pH ácido, debería ser una cepa de un microorganismo patógeno Gram-negativo (García *et al.*, 2005a).

Una vez que se han identificado los microorganismos patógenos más resistentes, el siguiente paso es establecer la frecuencia, o concentración máxima, de este microorganismo, que se considera aceptable para la seguridad pública, es decir, el *Objetivo de Seguridad Alimentaria* (FSO) (ICMSF, 2002). El FSO debe ser establecido por las correspondientes administraciones sanitarias y depende principalmente de la dosis infecciosa del microorganismo diana y de su capacidad para sobrevivir y crecer en el alimento, en condiciones normales de distribución y almacenamiento.

El nivel de inactivación mínimo necesario que se debe conseguir en el microorganismo más resistente (*Criterios del Resultado*, del inglés *Performance Criterion*) (ICMSF, 2002), en un proceso de pasteurización, debe asegurar el cumplimiento del FSO y depende principalmente de la concentración inicial del microorganismo en el alimento, y del crecimiento del microorganismo que pueda haber durante la posterior manipulación, almacenamiento, distribución y preparación del producto tratado. Como se ha indicado anteriormente, un posible criterio del resultado para los zumos de frutas pasteurizados mediante cualquier método, podría ser la reducción de 5 ciclos logarítmicos del microorganismo más resistente al proceso concreto de pasteurización, de relevancia en la salud pública (FDA, 2001).

Recientemente se ha demostrado que, dependiendo de las condiciones de tratamiento, una parte de la población microbiana tratada por PEAV no es inactivada, sino que está dañada subletalmente, pudiendo sobrevivir al tratamiento si las condiciones del medio son favorables, o si son adversas, resultando finalmente inactivadas (Pagán y Mañas, 2006). Cuando los microorganismos son dañados subletalmente en lugar de ser inactivados, es necesario asegurar que éstos no son capaces de reparar el daño y por lo tanto, sobrevivir y crecer durante el período de vida útil del producto. Se ha observado que, tras un tratamiento de PEAV en zumo de manzana a una población de *E. coli*, la inactivación obtenida fue aumentando con el tiempo, al mantener en almacenamiento este microorganismo, en el mismo medio de tratamiento (García *et al.*, 2005b). Por lo tanto, tras el tratamiento de PEAV las células supervivientes parecen ser más sensibles a un almacenamiento en medio ácido, incrementando de este modo el nivel de inactivación obtenido inmediatamente después del tratamiento. Sin embargo, cuando el daño puede ser reparado por el microorganismo, la existencia de células dañadas subletalmente podría sobreestimar la efectividad del tratamiento y, en consecuencia, el margen de seguridad alcanzado. Por lo tanto, para la obtención de datos con el fin de estimar la resistencia a los PEAV del microorganismo más resistente, se deben usar procedimientos que permitan recuperar el mayor número de células, y además identificar la posible existencia de una población dañada subletalmente.

Para aplicar correctamente un tratamiento de PEAV como proceso de pasteurización, es esencial demostrar que es posible alcanzar el criterio del resultado establecido para el microorganismo objetivo. Los parámetros de control que han de ser

aplicados para la consecución del criterio del resultado se denominan *Criterios del Proceso* (ICMSF, 2002). Como ya se ha comentado, dos de los principales parámetros que influyen en la resistencia microbiana a los PEAV son la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento (Wouters *et al.*, 2001a). El estudio de la cinética de inactivación microbiana y el desarrollo de modelos matemáticos predictivos son herramientas muy útiles para poder definir posibles combinaciones de intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento, de eficacia letal similar entre ellas, que permitan alcanzar el criterio del resultado y, además, establecer los requerimientos que debe cumplir el equipo de PEAV para poder aplicar dicho tratamiento a escala industrial. Otra de las posibilidades que ofrece la modelización es poder predecir la inactivación microbiana que se obtendría en condiciones de tratamiento que no han sido probadas experimentalmente. Sin embargo, antes de poder utilizar un modelo con estos propósitos, es preciso comprobar que las expresiones matemáticas describen con precisión el comportamiento de los microorganismos al ser procesados mediante PEAV en matrices alimentarias reales. Este último paso se conoce como validación.

Los estudios en equipos a escala, como mínimo, de planta piloto, son necesarios para confirmar que los parámetros del proceso establecidos para alcanzar un determinado resultado, en escala de laboratorio, se cumplen también en instalaciones de mayor escala. La validación del proceso en equipos industriales con microorganismos patógenos podría suponer un riesgo para los operarios y comprometer la seguridad sanitaria del entorno de la planta de procesado. Por ello, es recomendable realizar la validación del proceso en las plantas industriales con microorganismos no patógenos, cuyo comportamiento sea similar a los microorganismos patógenos, cuando se expongan a condiciones similares a aquellas aplicadas durante el procesamiento del alimento. La identificación de estos microorganismos, podría ser de gran interés para trasladar finalmente la tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje a la industria alimentaria.

En algunas circunstancias, podría ser necesario aplicar tratamientos de PEAV demasiado intensos para poder alcanzar un determinado criterio del resultado en los microorganismos diana. Estos tratamientos podrían afectar a las propiedades sensoriales y nutritivas del alimento procesado, o incluso, podrían no ser viables por las limitaciones técnicas de los equipos de PEAV. Con el propósito de aumentar la eficacia letal de los tratamientos de PEAV, o evitar el crecimiento de los

microorganismos durante el período de vida útil del producto, se han estudiado diferentes combinaciones de PEAV junto con otras tecnologías de conservación (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Álvarez y Heinz, 2007). Estas combinaciones, conocidas generalmente como “tecnología de las barreras”, podrían ser útiles para garantizar la seguridad de los alimentos. Por lo tanto, los criterios del proceso podrían englobar parámetros de control no solo de un paso del proceso, sino de varios pasos combinados. Un mejor conocimiento de los mecanismos que provocan la inactivación microbiana por PEAV podría contribuir al desarrollo adecuado de tratamientos combinados para alcanzar el nivel de inactivación deseado.

En conclusión, la manera más efectiva de asegurar la seguridad microbiológica de los alimentos es prevenir la contaminación de la materia prima en las primeras fases de la producción y procesado. Sin embargo, el gran número de posibles fuentes de contaminación microbiana durante la cadena de producción y procesado del alimento hace que la prevención de la contaminación del producto con microorganismos sea una tarea tremendamente difícil. Dado que se estima que la dosis infecciosa de algunos microorganismos patógenos es muy baja (Blackburn y McClure, 2002), la aplicación de tratamientos, por ejemplo de PEAV, los cuales tienen como objetivo la inactivación microbiana, son de vital importancia para la producción de alimentos microbiológicamente seguros. Establecer parámetros relativos tanto a las especificaciones microbiológicas, como a la tecnología de PEAV, tales como el *FSO*, *criterios del resultado* o *criterios del proceso*, podría contribuir a la implantación de los procesos de pasteurización de alimentos por pulsos eléctricos de alto voltaje en la industria alimentaria como una herramienta efectiva para mejorar la calidad sanitaria de los productos, y satisfacer al mismo tiempo la creciente demanda de alimentos con características organolépticas y nutritivas cada vez más parecidas a las del producto fresco.

1.3. MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LA PASTEURIZACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR PEAV

En este apartado se describen las principales características de los cuatro microorganismos utilizados en esta Tesis Doctoral. Debido a la importancia que tienen las envolturas celulares en la resistencia microbiana a los PEAV, antes de describir los microorganismos, se describen las características generales de los microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.

1.3.1. Microorganismos Gram-positivos

Tanto los microorganismos Gram-positivos como los Gram-negativos se componen de dos envolturas esenciales, la membrana citoplasmática y la pared celular (Figura 1.24).

Las características de la *membrana citoplasmática* son las mismas para ambos grupos microbianos. Es una bicapa de fosfolípidos de unos 8 nm de espesor que tiene como función principal mantener la integridad de la célula. Los fosfolípidos tienden a formar espontáneamente una estructura de bicapa, con su parte polar hacia el medio acuoso, aproximando las zonas hidrofóbicas entre sí. Esta estructura es bastante fluida y se estabiliza por medio de proteínas. La función de las proteínas no es tan solo estabilizar la membrana, sino que actúan como canales transmembrana o pueden tener función enzimática. Se estima que alrededor del 70% de la masa de la membrana es atribuible a las proteínas (Madigan *et al.*, 1997).

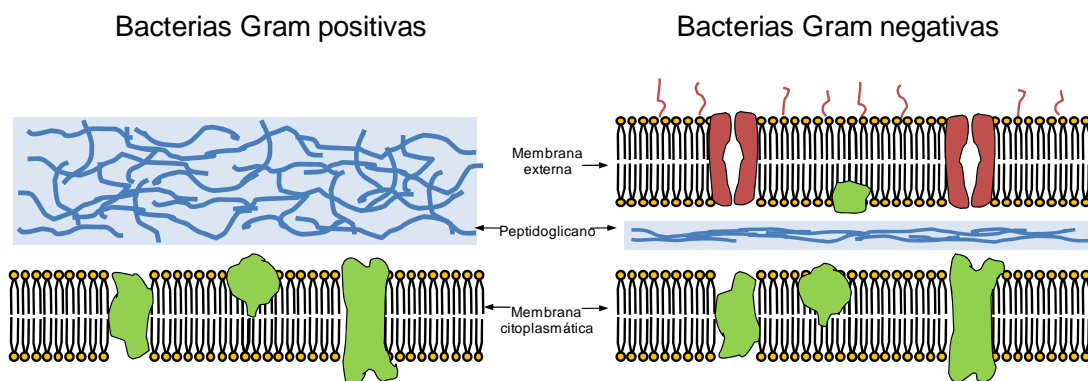


Figura 1.24. Estructura de las envolturas celulares de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (García, 2005c).

La *pared celular* tiene como función principal dar rigidez y forma a la célula. La pared de los microorganismos Gram-positivos está formada fundamentalmente por una capa ancha de peptidoglicano o mureína (Figura 1.24). Esta estructura se forma por derivados de los azúcares N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen la L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina. Estas moléculas forman cadenas con puntos de unión entre sí, de manera que se forma una red tridimensional muy rígida. En las bacterias Gram-positivas el péptidoglicano se presenta como una única capa y representa hasta el 90% de la pared (García, 2005c). Esto representa una importante barrera para los compuestos hidrofóbicos, ya que es una estructura muy polar. Este grupo bacteriano puede tolerar compuestos nocivos hidrofóbicos, tales como las sales biliares del intestino (García, 2005c).

1.3.1.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes fue descubierta a principios del siglo XX, cuando Murray *et al.*, (1926) aislaron un bacilo corto Gram-positivo en conejos y cobayas. Su denominación actual fue establecida por una parte como recuerdo al cirujano Joseph Lister, por sus avances en la microbiología médica, y por otra debido a que se aisló de los monocitos de la sangre (Pirie, 1940). Desde su descubrimiento, fue considerada como un patógeno para especies animales y no fue hasta la década de los 80 cuando se aceptó su patogenicidad también para los humanos.

Desde 1980, varios brotes importantes causados por este microorganismo han alarmado a las autoridades sanitarias. En 1979, aparecieron 20 personas afectadas de listeriosis en un hospital de Boston (Ho *et al.*, 1986). Los resultados de los cultivos no señalaron a ningún alimento como origen de la infección, sin embargo, los estudios de control de los casos apuntaron a un rasgo común, el consumo de hortalizas crudas tales como apio, tomates y lechuga. En las provincias costeras de Canadá, en 1981, fueron descritos 34 casos en niños en edad perinatal y 7 en adultos, con una mortalidad superior al 28% (Schlech *et al.*, 1983). Fue implicada la ensalada de col y el origen de la bacteria se estableció en la granja donde la col fue cultivada; éstas habían sido abonadas con estiércol de ovejas de un rebaño en el cual se detectaron casos de listeriosis. El más importante de los casos se produjo en California, en 1985, donde 142 personas resultaron afectadas, 93 niños en edad perinatal y 49 adultos. 48 de ellos

murieron como causa de la infección. La cepa implicada en el brote fue aislada en un queso tipo mexicano y en la planta donde fue elaborado. El brote cesó tras la retirada del queso del mercado (Linnan *et al.*, 1988).

De entre todas las listerias, *L. monocytogenes* es la especie más importante por su patogenicidad. *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* rara vez causan infección humana y *L. murrayi* y *L. innocua* se consideran apatógenas, siendo ésta última de uso generalizado en las investigaciones de laboratorio.

La tercera parte de las infecciones humanas por listerias son perinatales (mujeres gestantes y bebés), y las dos terceras partes restantes en personas del resto de las edades (adultos). La mayoría de infecciones por *L. monocytogenes* se dan en personas con un sistema inmune debilitado por causa de la edad, por enfermedades (tales como cáncer o SIDA), por transplantes o por tratamientos médicos como por ejemplo el uso de corticoesteroides (ICMSF, 1996). En los casos perinatales, la madre solo sufre fiebre moderada acompañada o no de síntomas de ligera gastroenteritis o de tipo gripal. Las secuelas en el feto son mucho más graves, y en ocasiones mortales, con afección en varios órganos y formación de lesiones granulomatosas como consecuencia de una septicemia generalizada. En los casos en que no provoca la muerte del feto, en ocasiones éste puede nacer con meningitis. En los casos de infecciones en adultos, solo la tercera parte de ellos padecen meningitis, y el resto bacteriemia (ICMSF, 1996).

La mayoría de los casos de listeriosis son debidos a la ingestión de alimentos contaminados, aunque también se han descrito lesiones cutáneas en humanos debido al manejo de ganado infectado por esta bacteria, e infecciones oculares accidentales en personal de laboratorio.

L. monocytogenes es un bacilo corto, de entre 0,5-2,0 μm de longitud y 0,4-0,5 μm de anchura, Gram-positivo, aeroanaerobio facultativo y no esporógeno. No todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas, pero todas las cepas patógenas son hemolíticas. En cultivos jóvenes, pueden formar cadenas cortas o en forma de “V”. Son microorganismos flagelados, de movimiento característico “de piruleta o barrilete”. Forma colonias en agar nutritivo tras 48 h. a 37°C, de alrededor de 0,2-0,4 mm de diámetro (Lovett, 1989).

Su temperatura óptima de cultivo se establece entre 30 y 37°C, aunque se ha registrado crecimiento entre 0 y 45°C. Es por lo tanto un microorganismo psicrótrofo. Su virulencia parece mayor cuando crece a temperaturas de refrigeración (Lovett, 1989), aunque en estos casos disminuye su resistencia a un posterior tratamiento térmico (Fedio y Jackson, 1989; Knabel *et al.*, 1990).

L. monocytogenes puede crecer en un amplio rango de pH, desde 4,0 (Conner *et al.*, 1990) hasta 9,6 (Bahk *et al.*, 1990). El rango de pH en el cual es capaz de crecer está condicionado por otros factores, como el ácido utilizado, la presencia de sal o nitritos o la temperatura de cultivo (Conner *et al.*, 1986; Farber *et al.*, 1989; Parish y Higgins, 1989; McClure *et al.*, 1991).

Es capaz de multiplicarse en condiciones ambientales muy diversas como carnes envasadas al vacío o atmósferas modificadas enriquecidas en dióxido de carbono a temperaturas superiores a 5°C (Gill y Reichel, 1989).

Como ya se ha comentado, su principal vía de transmisión al hombre es a través de los alimentos. Es un microorganismo ubicuitario en toda la cadena alimentaria, desde la granja hasta la mesa. *L. monocytogenes* ha sido aislada de una gran variedad de hábitats, entre los que se incluye el suelo, el ensilado, aguas residuales, ambientes donde se elaboran alimentos y en las heces de personas y animales sanos (ICMSF, 1996). En los alimentos, puede encontrarse con mayor frecuencia en leche y productos lácteos, y se ha detectado también en huevos y ovoproductos, carnes de pollo, cordero, cerdo o ternera, pescado, marisco, verduras y hortalizas (Lovett, 1989). Por todo ello, la prevención de la listeriosis humana debe comenzar en la propia granja y a lo largo de todo el proceso de elaboración de los alimentos, con especial cuidado en los tratamientos de conservación, las posibles recontaminaciones y el almacenamiento. Por ejemplo, la correcta elaboración del ensilado es un punto crítico, para conseguir una acidificación rápida del mismo, por debajo de pH 4,0 y evitar así el desarrollo de la bacteria, y una posible infección posterior al ganado.

En los lugares de producción de los alimentos se debe evitar la multiplicación bacteriana en la materia prima, utilizar tratamientos listericidas que garanticen la destrucción de *L. monocytogenes* (tales como una correcta pasteurización térmica o un tratamiento equivalente), y reducir al mínimo el riesgo de recontaminación.

Existe falta de información respecto a la dosis infecciosa mínima, aunque generalmente se cree que es necesaria una tasa de contaminación superior a las 100 UFC/mL o g para que pueda producirse la infección (EFSA, 2010). Es por ello que los límites de *L. monocytogenes* en alimentos están establecidos en ausencia en 25 g de producto, al final de la cadena de elaboración del producto, y de menos de 100 UFC/g a lo largo de la vida útil del producto (EFSA, 2010).

En el año 2008, en la Unión Europea, se detectaron 1381 casos de listeriosis (0,3 casos por cada 100.000 habitantes) con una tasa de mortalidad del 20,5%. Esta tasa es un 11% menor que la de 2007, y de hecho, el número de casos se ha ido reduciendo en la U.E. desde 2006 cuando alcanzó su mayor nivel. En España, la tasa fue algo menor en 2008, de 0,2 casos por cada 100.000 habitantes. En 2008, se detectaron 88 casos, el número de casos más elevado desde los 100 casos de 2004 (EFSA, 2010).

La ubicuidad y capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes*, e incluso su capacidad de desarrollo en un amplio rango de temperaturas, pH o concentración de sales, hacen de este microorganismo de especial preocupación en la industria alimentaria. Su posible supervivencia a un proceso de higienización hace su proliferación posterior más probable, especialmente a temperaturas de refrigeración, en las que logra imponerse a otras especies microbianas. Los alimentos refrigerados son, por tanto, un riesgo especial para el consumidor. Por su posible supervivencia frente a tratamientos clásicos de pasteurización, el estudio de la resistencia de *L. monocytogenes* frente a los tratamientos de PEAV resulta de gran utilidad.

1.3.1.2. *Staphylococcus aureus*

La denominación *Staphylococcus* significa racimos de uva, ya que su crecimiento es en forma de grupos de pequeñas esferas que se expanden en las 3 dimensiones del espacio. A finales del siglo XIX, Rosenbach describió el crecimiento de esta bacteria en un cultivo puro por primera vez y lo llamo *Staphylococcus aureus*, debido al color anaranjado de sus colonias (Baird-Parker, 1990).

En 1914, Barber demostró claramente la intoxicación estafilocócica por beber leche que se había guardado sin refrigerar, procedente de una vaca que padecía una mastitis estafilocócica. Más tarde, Dack *et al.* (1930) demostraron que el filtrado

estéril de un cultivo puro de un estafilococo amarillo aislado de un postre navideño a base de nata causó los síntomas típicos de la intoxicación alimentaria en personas voluntarias.

Staphylococcus aureus son bacterias en forma de cocos, de diámetro entre 0,5-1,5 μm , Gram-positivos, catalasa positivos y de metabolismo anaerobio facultativos. Su característica más representativa es que son capaces de crecer a una a_w de hasta 0,85.

El reservorio principal de este microorganismo son las personas (Jablonski y Bohach, 2001), aunque se puede aislar de la piel y mucosas de la mayoría de animales de sangre caliente. Es un patógeno oportunista que puede causar infección a través de una herida abierta o como consecuencia de cambios en la fisiología del hospedador. Se estima que en algún momento, hasta el 50% de las personas serán portadoras de este organismo. Las vehiculaciones nasal y perineal son muy frecuentes, seguidas de manos y otras partes del organismo (ICMSF, 1996).

Numerosas investigaciones han demostrado la presencia de *S. aureus* en muchos tipos de productos alimenticios, como carne de vaca, embutidos de cerdo, carne de pavo, salmón, ostras o ensaladas (Surkiewicz *et al.*, 1972, 1975; Baer *et al.*, 1976). La intoxicación estafilocócica aparece muy frecuentemente cuando un alimento cocido es contaminado por una persona colonizada y se almacena en un ambiente caliente (20-40°C) durante algunas horas. Aunque compite mal contra otros microorganismos, fuera de los organismos vivos resiste con facilidad en condiciones adversas, y puede producir toxina en alimentos de a_w de hasta 0,85. Además es muy resistente a la congelación, y puede sobrevivir en alimentos que se mantengan a menos de -20°C. Su crecimiento óptimo se encuentra entre 35 y 40°C, con límites entre 7 y 48°C. Las toxinas son producidas en unas condiciones algo más limitadas (ICMSF, 1996).

S. aureus produce una gama especialmente amplia de sustancias asociadas a la enfermedad, entre ellas las enterotoxinas responsables de la intoxicación alimentaria. Son proteínas de bajo peso molecular, clasificadas en siete tipos diferentes. La mayoría de brotes de intoxicación alimentaria implican las enterotoxinas A y D, que se forman en los alimentos en una gama de valores de pH y a_w más amplia que el resto de enterotoxinas estafilocócicas. Los biotipos humanos de *S. aureus* producen enterotoxinas más frecuentemente que el resto de biotipos animales (Isigidi *et al.*,

1992). Aunque la aparición de enfermedad debido a la toxina depende del peso y la sensibilidad de cada individuo, se coincide que entre 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ causa enfermedad en una persona (Everson *et al.*, 1988).

Además de posibles infecciones agudas, como septicemias, las enfermedades más frecuentes causadas por *S. aureus* son las toxemias agudas como la intoxicación alimentaria estafilocócica. Los síntomas aparecen entre 1 y 7 horas tras la ingestión (generalmente de 2 a 4 horas) y suelen cursar con náuseas, vómitos, espasmos abdominales y diarrea, con cefalalgia y colapso en los casos más graves. La curación es rápida, en el plazo de 2 días. El modo de acción de la toxina no ha sido esclarecido del todo, pero se cree que los síntomas gastrointestinales son el resultado de la estimulación de neuroreceptores locales existentes en el tracto intestinal (ICMSF, 1996). Cabe destacar que las enterotoxinas producidas por este microorganismo son particularmente resistentes al calor. Así, se ha demostrado su capacidad para soportar los tratamientos convencionales de esterilización (20 minutos a 121°C), aunque esta resistencia se ve muy afectada, entre otros factores, por el pH del medio de tratamiento (Baird-Parker, 2000).

En la Unión Europea, las toxinas bacterianas (sobre todo por *Bacillus*, *Clostridium* y *Staphylococcus*) suponen la tercera causa de brotes de enfermedad alimentaria por detrás de las salmonelosis y los virus (Figura 1.26). En 2008, se produjeron 2994 casos de intoxicaciones alimentarias, algo más que en 2007. Las intoxicaciones por las enterotoxinas estafilocócicas suponen el 5,5% del total de los brotes en 2008 en la U.E. El país más afectado en este aspecto es Francia, con aproximadamente el 72% de los casos (dos de ellos mortales), seguido de España, que registró alrededor del 11% de todos los casos de intoxicación por toxina estafilocócica (EFSA, 2010).

Los límites de concentración de esta bacteria, según la normativa actual, en alimentos varían en función del alimento. En algunos productos cárnicos y en preparados de frutas y verduras congeladas, se establece un máximo de 100 UFC/g, mientras que en las semiconservas se exige la ausencia en un gramo de muestra.

Debido a su resistencia en un amplio rango de condiciones, y su presencia como huésped habitual en el ser humano, se considera a esta bacteria como un importante patógeno alimentario. Por otro lado, sus características fenotípicas, una de las bacterias

más pequeñas esféricas relacionadas con la industria alimentaria, hacen que el estudio de su resistencia a los PEAV sea considerado de especial interés.

2.3.2. Microorganismos Gram-negativos

La estructura de la membrana citoplasmática de los microorganismos Gram-negativos es similar a la de los Gram-positivos, como ya se ha indicado. Se diferencian de estos últimos en la estructura de la pared celular.

La capa de peptidoglicano o mureína es mucho más fina que en los Gram-positivos, y se presenta como una capa única. Constituye alrededor del 10% del total de la pared. Externamente a la capa de mureína se encuentra la membrana externa (Figura 1.24).

La *membrana externa* de las bacterias Gram-negativas es una segunda bicapa lipídica, aunque de composición diferente a la membrana citoplasmática. Se compone de fosfolípidos, polisacáridos y proteínas. La semicapa interna de la membrana externa se parece bastante a la membrana citoplasmática, pero la semicapa externa se compone de lípidos y polisacáridos que se unen para formar estructuras lipopolisacáridicas específicas. Esta estructura presenta gran eficacia para excluir compuestos hidrofóbicos cuando se encuentra intacta (García, 2005c). Además, en la semicapa externa de la membrana externa se encuentran unas proteínas llamadas porinas (Neidhardt *et al.*, 1990), que actúan como canales y hacen que esta capa sea bastante permeable a moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular (hasta 700 daltons). La membrana externa no es permeable a enzimas u otras moléculas de gran tamaño.

2.3.2.1. *Escherichia coli*

Originariamente denominado *Bacterium coli*, fue aislado por Escherich hace más de dos siglos en las heces de niños (Wilson *et al.*, 1983). Recibe su actual nombre de su descubridor desde 1920. Desde mediados de los 40, los países desarrollados han ido adoptando medidas para el control de *Escherichia coli* ya que su papel como enteropatógeno ha sido ampliamente demostrado.

E. coli son representantes de la familia *Enterobacteriaceae*, por lo que son bacilos cortos Gram-negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. Típicamente son rojo metilo positivas, Voges-Proskauer negativas y no crecen en medio citrato de Simmons; la mayoría de las cepas producen indol (IMViC +++- o -+--) (ICMSF, 1996).

Las cepas patógenas que provocan la enfermedad diarreica se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serogrupos de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular). Estas clases incluyen a *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

EPEC: Provoca una lesión característica del intestino, que implica la destrucción de las microvellosidades (Polotsky *et al.*, 1977). Se adhieren a las células mediante una proteína específica de la membrana externa denominada *factor de adherencia*.

ETEC: Es la causa principal de diarrea infantil en los países en desarrollo y la primera causa de diarrea del viajero en algunos países desarrollados. Afecta al intestino delgado proximal. Se fija a la pared intestinal mediante fimbrias, llamadas *factores de colonización*. Además produce dos tipos principales de toxinas, la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). La primera produce un aumento de la secreción de las células de las criptas y una disminución de la absorción de las células del extremo de las vellosidades (Field, 1979). Por su parte, la ST actúa principalmente como un antiabsorbente.

EIEC: Este grupo guarda un parecido estrecho con *Shigella* en cuanto a patología. Atacan de modo específico al colon, invadiendo las células epiteliales, multiplicándose y finalmente causando la ulceración del intestino. Produce un polipéptido de membrana emparentado antigénicamente con otro que produce *Shigella*, implicado en la capacidad invasora de la bacteria.

EHEC: Fue identificado por primera vez como patógeno en 1982, cuando se relacionó con dos brotes de colitis hemorrágica en Oregon y Michigan, tras el consumo de hamburguesas (Riley *et al.*, 1982). De entre sus factores de virulencia destacan las verotoxinas VT1 y VT2 (o SLT-I y SLT-II, del inglés *Shiga like toxin*, por su parecido a la toxina Shiga). La verotoxina provoca la muerte de la célula intoxicada por medio de la inhibición de proteínas (O'Brien y Holmes, 1987). La colonización tiene lugar principalmente en el intestino grueso. La bacteria coloniza primero la pared intestinal y produce posteriormente verotoxina(s). En este grupo se incluye a *E. coli* O157:H7.

Cabe destacar que *E. coli* O157 es causa en el 10-15% de los pacientes el síndrome hemolítico urémico (SHU) (Tarr *et al.*, 2005; Scheiring *et al.*, 2008). Esta grave enfermedad, que puede acarrear la muerte del paciente por fallo renal, en alrededor de un 4% de los casos, afecta sobre todo a niños menores de 5 años. Los síntomas de este síndrome y de otras afecciones causadas por *E. coli* se resumen en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Signos y síntomas de la enfermedad relacionada con *E. coli* (ICMSF, 1996).

Tipo de <i>E. coli</i>	Tiempo para el comienzo	Duración de la enfermedad	Síntomas
EPEC	17-72 h.	6 h.-3 d.	Diarrea, náuseas, dolor abdominal, vómito, cefalagia, fiebre, escalofríos. La diarrea es acuosa con abundante cantidad de moco, pero no sangre.
ETEC	8-44 h.	3-19 d.	Diarrea acuosa, fiebre ligera, retortijones abdominales, malestar, náuseas. En la forma más grave, se parece al cólera, con diarrea intensa parecida al agua de arroz que acaba en deshidratación.
EIEC	8-24 h.	Días a semanas.	Diarrea profusa o disentería, escalofríos, fiebre, cefalagia, mialgia, retortijones abdominales. Con frecuencia, las deposiciones contienen moco y vetas de sangre.
EHEC	3-9 d.	2-9 d.	Colitis hemorrágica. Diarrea muy sanguinolenta, dolor abdominal intenso, vómito, sin fiebre. SHU: pródromo de diarrea sanguinolenta, nefropatía aguda, convulsiones, coma y muerte. Púrpura trombótica trombocitopénica: similar al SHU, pero con fiebre y trastorno del sistema nervioso central.

Algunas cepas de *E. coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas desde 7°C hasta 46°C aunque su temperatura óptima se encuentra entre 35 y 40°C. Esta bacteria sobrevive bien en alimentos a temperaturas tanto de refrigeración (3-7°C) como de congelación (-20°C). Su sensibilidad al pH depende del ácido presente en el medio. Así, es capaz de crecer en pH 4,6 ajustado con HCl, pero no al mismo pH cuando se ajusta con ácido láctico.

Las personas portadoras, tanto sintomáticas como asintomáticas, son el reservorio principal de EPEC, EIEC y ETEC. Son excretados por las heces, de manera que los productos pueden ser contaminados por manipuladores de alimentos o por el contacto con agua contaminada. También es un reservorio importante el tracto gastrointestinal de ganado vacuno y pequeños rumiantes de EHEC. La contaminación fecal en los mataderos, o de las hortalizas con agua contaminada puede ser el origen de esta bacteria en los alimentos (ICMSF, 1996), como se muestra en la Figura 1.25 (Pennington, 2010). Debido a ello, en las últimas décadas se han registrado brotes toxiinfecciosos causados por una gran variedad de alimentos, tales como leche cruda, carne, productos de origen vegetal e incluso agua contaminada con *E. coli* O157:H7 (Doyle, 1991; Besser *et al.*, 1993; McCarthy, 1996; Cody *et al.*, 1999; Willshaw *et al.*, 2000). Aunque la fuente principal de esta bacteria es la carne de vacuno, cada vez existen más indicios de que *E. coli* O157:H7 pueda sobrevivir y crecer en las hortalizas. A 12 y 21°C, las cifras de microorganismos aumentaron rápidamente en lechuga y pepino en atmósferas compuestas por un 3% de oxígeno y un 97% de nitrógeno, parecidas a las que se usan a escala comercial (Abdul-Raouf *et al.*, 1993).

En los países desarrollados, los brotes causados por EPEC, EIEC o ETEC se presentan muy raramente. Por el contrario, durante la década de los 80, en EE.UU., Canadá, y Reino Unido fueron descritos muchos brotes de infección por *E. coli* O157:H7 relacionados con el consumo de carne picada de vacuno insuficientemente cocinada o, en menor medida, con el consumo de leche cruda (Doyle, 1991).

En 2008, se registraron 3159 casos de *E. coli* verotoxigénico en la Unión Europea, un 8,7% más que en 2007, lo que supone una tasa de 0,7 casos por cada 100.000 habitantes (EFSA, 2010). De ellos, 1673 se correspondieron con *E. coli* O157 y 146 casos cursaron con SHU, sobre todo en Francia, Alemania, Italia y Reino Unido. En España, sólo se registraron 21 casos en 2008, la totalidad de ellos correspondientes

a *E. coli* O157. Aunque la tasa en España es mucho menor que la media europea, el número de casos no ha dejado de crecer desde 2005 (EFSA, 2010). Pese a que no se conoce exactamente, la dosis infectiva de *E. coli* O157:H7 es baja. Un cálculo de riesgo (Shinagawa, 1997) realizado en Japón relacionado con un brote a partir de ensaladas y marisco estableció la probabilidad de infección por cada bacteria de *E. coli* O157 en 0,93%, y una probabilidad de desarrollo de enfermedad del 55% entre los infectados.

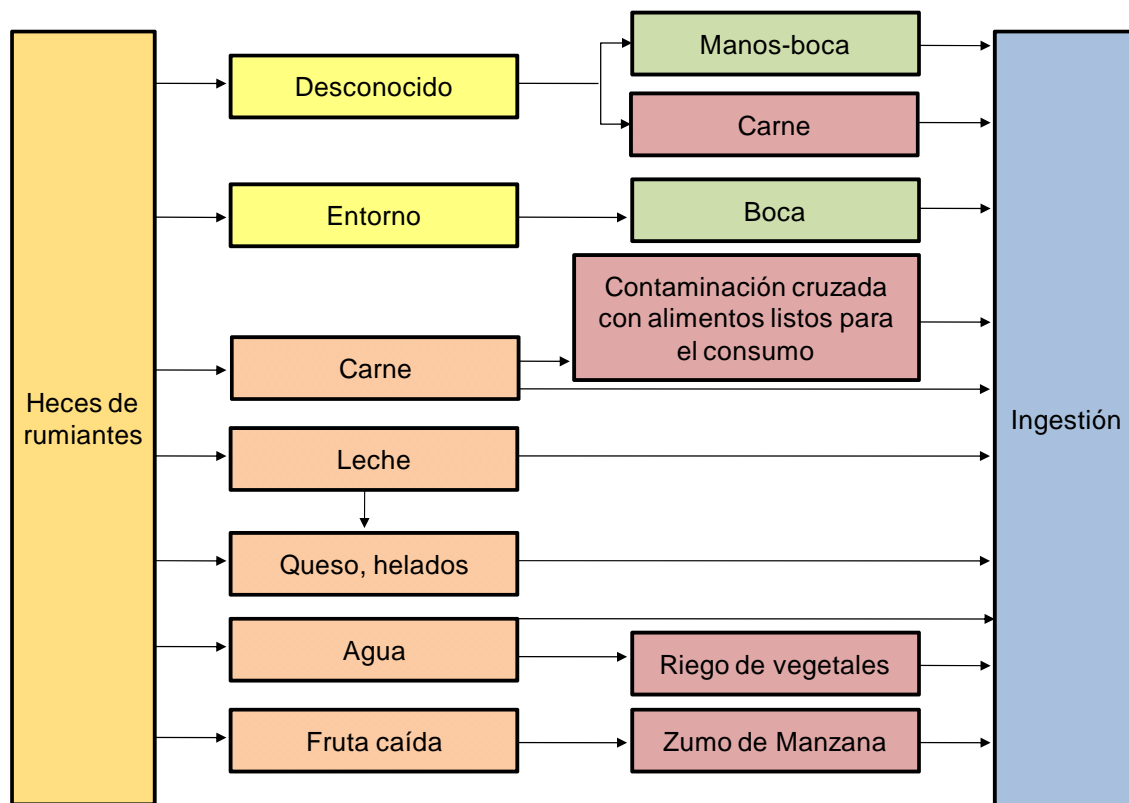


Figura 1.25. Posibles vías de transmisión de *E. coli* O157 (adaptada de Pennington, 2010).

E. coli patógeno es, por su ubicuidad y por la gravedad de sus lesiones, uno de los riesgos más serios para la salud en la actualidad en el sector alimentario. Además, el número de casos está en aumento tanto en países en vías de desarrollo como en los países más desarrollados, suponiendo en algunos casos un grave problema de salud pública. Por ello, su inclusión en cualquier estudio que tenga como objetivo la inactivación microbiana parece fundamental y de gran interés para la industria agroalimentaria.

1.3.2.2. *Salmonella* Typhimurium

Ya en 1874, Budd dedujo que la fiebre tifoidea era transmitida por el agua y los alimentos. La especie tipo *Salmonella choleraesuis* fue aislada en cerdos en los que se diagnosticó clínicamente peste porcina (Salmon y Smith, 1885). El nombre actual del género fue acuñado por Lignières en 1900 en honor a la investigación del Dr. Salmon, veterinario estadounidense, quien estudió en profundidad las bacterias entonces conocidas como tífica y paratífica.

A lo largo de los años, su clasificación ha experimentado numerosos cambios. En la actualidad, todas las salmonelas pertenecen a dos especies: *Salmonella bongori*, cuyas serovariedades son muy poco frecuentes, y *Salmonella enterica*, con más de 2500 serovariedades y dividido a su vez en seis subespecies, (*enterica*, *salmae*, *houtanae*, *arizonae*, *diarizonae* e *indica*). Las serovariedades se establecen según la presencia de antígenos O (somáticos), H (flagelares) y V_i (capsulares). Todas las serovariedades de *S. enterica* subsp. *enterica* tienen su propia denominación. A este último grupo pertenecen las dos serovariedades de mayor importancia en los alimentos, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium.

Durante muchos años, las fiebres tifoideas causadas por *Salmonella typhi* fueron las principales infecciones causadas por *Salmonella* en humanos. A partir de la década de los 70, los casos de gastroenteritis humanas producidas por salmonelas no tifoideas empezaron a aumentar a un ritmo alarmante (Tauxe, 1991). Tradicionalmente, *Salmonella* Typhimurium ha sido el más frecuentemente aislado de salmonelosis humanas transmitidas por el consumo de alimentos (D'Aoust, 1989; Tauxe, 1991). Sin embargo, a finales de la década de los 80 comenzó a detectarse un importante aumento del serotipo *Salmonella* Enteritidis, asociado principalmente a huevos y ovoproductos (D'Aoust, 1989; Tauxe, 1991). Otros estudios sugieren que *Salmonella* Typhimurium ha vuelto a recobrar parte de su protagonismo tradicional durante la última década del pasado siglo (Zeidler, 1997; Mazón *et al.*, 1998). En cualquier caso, entre estos dos serotipos aglutinan más de la mitad de todos los episodios registrados de salmonelosis en humanos (Dorronsoro *et al.*, 1998; Mazón *et al.*, 1998; EFSA, 2010).

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo aeroanaerobio facultativo, no formador de esporos, Gram-negativo y móvil gracias a

que poseen flagelos peritricos (Holt *et al.*, 1994). Su identificación mediante el test IMViC responde al patrón - + - + (ICMSF, 1996).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C, aunque es capaz de desarrollarse entre 5 y 47°C. Aunque a temperaturas tan bajas, la mayoría de las cepas no son capaces de crecer, se ha observado que algunas cepas de *Salmonella* Typhimurium sí pueden hacerlo incluso a temperaturas de 2°C. A temperaturas de congelación, -20°C, la viabilidad de *Salmonella* a penas se ve afectada (D'Aoust, 1989).

El límite inferior de a_w está en 0,92-0,94, y su rango de pH va desde 4,5 a 9,0, con el punto óptimo entre 6,5 y 7,5 (D'Aoust, 1989).

Las salmonelas tienen su hábitat natural en el intestino del hombre y los animales. Son excretadas con las heces, que contaminan el medio y los alimentos, de manera que al ser ingeridas de nuevo, colonizan el intestino del nuevo hospedador y comienzan el ciclo (Jay, 1992). Se multiplican en el intestino delgado, para colonizar después el íleon y en menor grado el colon. Se puede producir una reacción inflamatoria, los folículos linfáticos pueden aumentar de tamaño y se pueden ulcerar. Los ganglios mesentéricos con frecuencia se inflaman. En ocasiones, las salmonelas atraviesan las barreras mucosa y linfática y llegan al torrente sanguíneo, para acabar originando abscesos en varios tejidos (ICMSF, 1996). Pueden producir *gastroenteritis*, *fiebre entérica* y *bacteriemia*.

Los signos de la *gastroenteritis* comienzan entre 12 y 36 horas después de la ingestión del alimento contaminado. Cursan con diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebre ligera y escalofríos. A veces hay vómitos, abatimiento, anorexia, cefalagia y malestar. El síndrome puede durar de 2 a 5 días. En los primeros días, las excreciones del paciente contendrán gran cantidad de salmonelas y su concentración irá disminuyendo paulatinamente hasta aproximadamente unos 3 meses, cuando aun pueden encontrarse salmonelas no tíficas en heces (ICMSF, 1996).

El periodo de incubación de la *fiebre entérica* varía desde 7 a 28 días en función de la dosis bacteriana. Dura unos 14 días de promedio, en los cuales hay malestar, cefalagia, fiebre alta persistente, dolor abdominal y generalizado en el resto del cuerpo, debilidad y puede acompañarse bien con diarrea, bien con estreñimiento. En

otros casos, se observa un ritmo cardíaco lento, aumento del tamaño del bazo y hemorragia intestinal o nasal. El paciente puede llegar a desvariarse. Es una enfermedad de evolución lenta en la que el estado de portador se puede prolongar hasta varios meses (ICMSF, 1996).

La septicemia o *bacteriemia* representa la presencia de salmonelas en la sangre. El resultado es una fiebre alta persistente, dolor en el dorso, abdomen y tórax, escalofríos, sudoración, malestar, anorexia y pérdida de peso. Una de las cepas de *Salmonella* propensa a invadir el torrente sanguíneo es *Salmonella* Typhimurium. Puede causar infecciones focales en varios tejidos (ICMSF, 1996).

Aunque su hábitat es el intestino del hombre y animales, su presencia es generalizada fuera de éste. El vehículo más habitual para la infección del hombre por *Salmonella* es por medio de los alimentos, especialmente los de origen animal, y aquellos que están expuestos a contaminación por aguas residuales. Los alimentos que con mayor frecuencia vehiculan salmonelas son los huevos y ovoproductos, carnes de pollo, ternera, cerdo, pavo, leche y lácteos, chocolate y especias (D'Aoust, 1989; Tauxe, 1991). La carne se contamina desde las heces que se adhieren en el pelo, piel y patas de los animales, y por un eviscerado incorrecto. En las aves de corral, las bacterias llegan a la canal de igual modo desde el tracto intestinal o desde el material fecal de patas y plumas. En el caso de los huevos, la contaminación puede ser transovárica, en la superficie de la cáscara durante el tránsito del huevo por la cloaca de la ponedora o ya en el exterior, por contacto con material fecal. En la leche, *Salmonella* llega a las ubres debido a una higiene deficiente de la granja y de los operarios, y menos frecuentemente debido a infecciones del animal. El agua contaminada es otro de los posibles vehículos, que además puede vehicular salmonelas a otros alimentos de origen vegetal como cereales, frutas o especias (D'Aoust, 1989). *Salmonella* puede sobrevivir en los alimentos durante mucho tiempo. En una serie de hortalizas que incluían judías verdes, remolacha, col, zanahorias, apio, pepino, lechuga, pimientos, rábanos, espinacas y tomates, este microorganismo sobrevivió convenientemente durante más de 28 días a 2-4°C (Felsenfeld y Young, 1945). La dosis infecciosa depende de la composición del alimento (cantidad de agua o grasa). Según la normativa actual, se establece que debe haber ausencia de *Salmonella* en 25 g en prácticamente todos los alimentos, como huevo y ovoproductos, carne de cerdo o zumos de frutas.

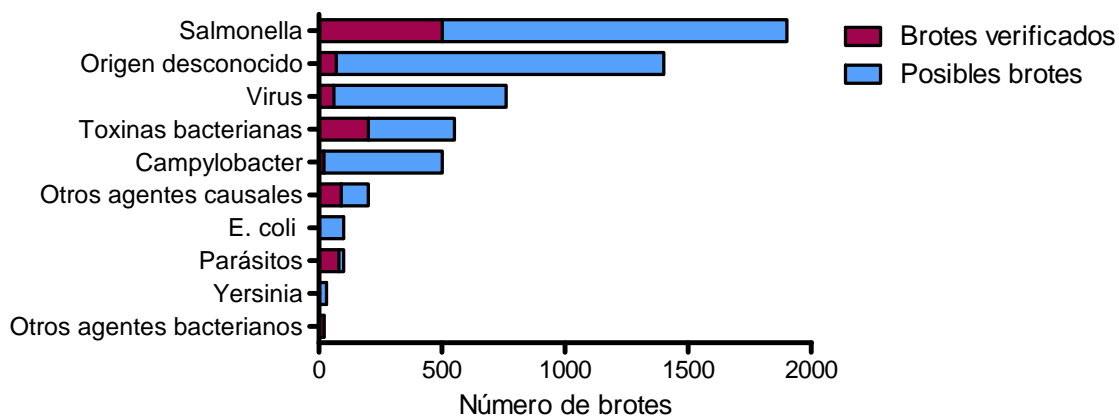
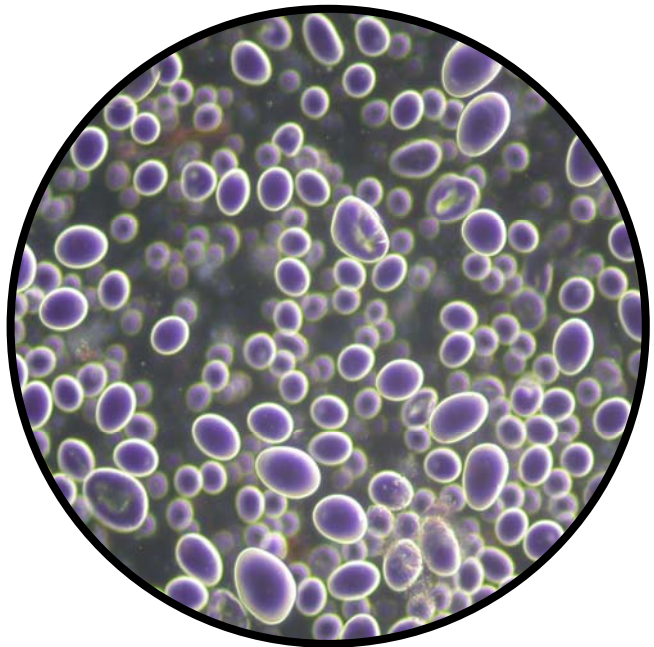


Figura 1.26. Agentes causales de los brotes de origen alimentario en la U. E. en 2008 (EFSA, 2010).

Aunque los datos indican que los casos de salmonelosis están disminuyendo en la Unión Europea en los últimos años, *Salmonella* sigue siendo el primer agente causal de infecciones alimentarias en todos los países miembros (Figura 1.26). El 35,4% de los brotes en 2008 fueron debidos a salmonela, sobre todo por *Salmonella* Enteritidis en huevos y ovoproductos, y *Salmonella* Typhimurium en carne. En 2008, se registraron 131.468 casos de salmonelosis en la U.E., un 13,5% menos que en 2007, lo que representa 26,4 casos por cada 100.000 habitantes, con un aumento de la incidencia en los meses de verano y otoño (EFSA, 2010). En España, el 100% de los casos de salmonelosis son domésticos (es decir, se han producido dentro de nuestras fronteras y no como consecuencia de viajes desde otros países). El número de casos se ha ido reduciendo paulatinamente desde 2004, aunque todavía se registraron 3.833 casos en 2008, 8,5 casos por cada 100.000 habitantes. Esta tasa está muy lejos de los 52,2 casos por cada 100.000 habitantes de Alemania (42.909 casos en total) o los 103,1 casos por cada 100.000 habitantes de la República Checa (10.707 en total) (EFSA, 2010). Los niños de corta edad son el grupo de la población más propensa a sufrir enfermedad por *Salmonella*, aunque la mayoría de casos mortales se registran en ancianos.

A pesar de los esfuerzos invertidos en controlar la presencia de este organismo en los alimentos, a día de hoy, continúa siendo la primera causa de toxiinfecciones alimentarias, y representa uno de los problemas más serios de salud pública a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. La importancia de incluir *Salmonella* en cualquier tipo de estudio relacionado con la conservación de los alimentos está fuera de toda duda.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



En la actualidad, el consumidor espera encontrar en el mercado alimentos procesados que, además de ser inocuos, tengan unas características similares a las de los productos frescos. Con objeto de obtener alimentos con estas características, la industria alimentaria puede utilizar distintas estrategias como el uso de tecnologías de procesamiento respetuosas con las propiedades de los alimentos. Entre estas tecnologías se encuentran los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV), que son capaces de inactivar a los microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesamiento térmico, por lo que se evitan los efectos adversos que el calor ejerce sobre las propiedades sensoriales y nutritivas de los alimentos.

Es bien sabido que los PEAV son capaces de inactivar las formas vegetativas de las bacterias, mohos y levaduras. Sin embargo, los esporos bacterianos son resistentes a estos tratamientos. Por ello, el objetivo de esta tecnología es ser una alternativa a los actuales tratamientos de pasteurización por calor que se aplican en la industria alimentaria. La implantación de la tecnología de los PEAV en la industria para la pasteurización de los alimentos requiere demostrar no solo que las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos no se ven afectadas por los tratamientos, sino que los niveles de seguridad microbiológica que se obtienen con estas tecnologías son equivalentes a los obtenidos mediante el procesamiento térmico al cual pretenden sustituir. Para comprobar este segundo aspecto, es necesario identificar las cepas de microorganismos patógenos más resistentes a los PEAV y establecer condiciones de tratamiento (criterios de procesamiento) aplicables en la práctica, que permitan reducir la población de estos microorganismos hasta un nivel que garantice la seguridad de los alimentos.

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre la inactivación microbiana por PEAV. En dichos estudios, los tratamientos se han aplicado con cámaras de tratamiento tanto estáticas como en flujo continuo, y los microorganismos investigados se han tratado tanto en tampones como en los propios alimentos. Estas investigaciones han permitido identificar los principales parámetros de procesamiento, propiedades del medio de tratamiento y características de los microorganismos que influyen en la eficacia del proceso. Sin embargo, por distintas razones, a partir de estos estudios no es posible establecer las condiciones de tratamiento que sería necesario aplicar a un alimento para garantizar su seguridad microbiológica. La mayoría de los estudios publicados en la bibliografía,

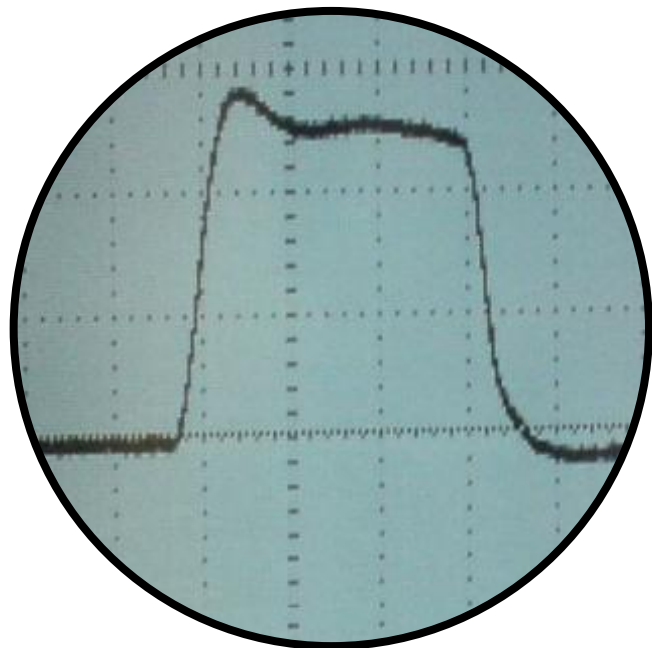
especialmente los realizados en flujo continuo, han sido llevados a cabo con microorganismos alterantes, sin interés desde el punto de vista de la salud pública. Por otra parte, las distintas condiciones de tratamiento y equipos de procesado utilizados en distintos laboratorios, dificultan enormemente la comparación de los datos y, por lo tanto, la definición de los parámetros de los tratamientos necesarios para la pasteurización de los alimentos. Finalmente, la mayoría de los estudios han sido realizados con intensidades de campo eléctrico muy elevadas y/o con tiempos de tratamiento muy prolongados. Estos tratamientos, por distintos motivos, no son adecuados en un procesado industrial. Por un lado, se necesitarían generadores de PEAV muy potentes para conseguir esos campos eléctricos tan elevados. Por otro, la aplicación de un número elevado de pulsos en los cortos tiempos de residencia del producto en la cámara de tratamiento provocaría un incremento de la temperatura del producto que podría afectar a las propiedades nutritivas y sensoriales del alimento. La utilización de varias cámaras de tratamiento conectadas en serie con sistemas de refrigeración entre ellas, que podría evitar este aumento de temperatura, supone un importante aumento del coste energético del proceso total, ya que habría que considerar tanto la energía necesaria para la aplicación del propio tratamiento de PEAV como la energía necesaria para mantener el producto a temperaturas que no afectaran a las características del producto.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue **establecer criterios del proceso aplicables en un proceso industrial para la pasteurización de alimentos líquidos por medio de la tecnología de los PEAV**. Para alcanzar este objetivo general, fue necesaria la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- **Identificar las cepas más resistentes** a la tecnología de los PEAV, entre cinco cepas de dos microorganismos patógenos Gram-positivos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) y dos microorganismos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*).
- **Obtener datos cinéticos** sobre la inactivación de la cepa más resistente de cada uno de los microorganismos a distintas intensidades de campo eléctrico en el rango de pH de la mayoría de los alimentos.

- **Generar modelos matemáticos** a partir de los datos cinéticos para comparar la resistencia de las cepas resistentes en un amplio rango de condiciones experimentales.
- **Desarrollar procesos combinados** de los PEAV con otros factores (temperatura, antimicrobianos) para obtener los niveles de inactivación requeridos para la pasteurización de los alimentos en condiciones de tratamiento aplicables en la práctica industrial.
- **Validar los resultados** obtenidos en procesos en flujo continuo en zumo de manzana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. MEDIOS Y REACTIVOS

El agar tripticasa-soja (TSA) y el caldo tripticasa soja (TSB) fueron suministrados por la firma Biolife (Milán, Italia) y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Éstos se suplementaron con un 0,6% de extracto de levadura (TSA+YE y TSB+YE, respectivamente) suministrado por la misma casa comercial. El agua de peptona fue preparada a partir de peptona de carne (Biolife) disolviendo un 0,1% (p/v) en agua destilada. Para los estudios de detección de daño subletal tras los tratamientos de PEAV, se añadió la correspondiente cantidad de NaCl (Panreac, Barcelona, España) al agar TSA+YE según el microorganismo investigado (TSA+YE+NaCl).

Los tampones McIlvaine fueron preparados con las concentraciones apropiadas de fosfato disódico anhidro (Panreac, Barcelona, España) y ácido cítrico anhidro (Panreac) según describen Dawson *et al.* (1974). El pH de los tampones se ajustó a 7,0, 6,0, 5,25, 4,5, 4,0 y 3,5 con el fin de abarcar el rango de pH de diferentes alimentos líquidos. Las medidas de pH se llevaron a cabo con un pH-metro con compensación automática de temperaturas (modelo Basic 20⁺, Crison Instruments, Barcelona, España).

Los tampones se diluyeron con agua destilada hasta una conductividad eléctrica de $0,1 \pm 0,01$ S/m. Las medidas de conductividad se realizaron con un conductivímetro (mod. 524, Crison Instruments, S.A. Alella, Barcelona, España) a temperatura ambiente.

Todos los medios, una vez preparados, se esterilizaron a 121°C en un autoclave (Certoclav CV 2000/I, Traun, Suiza) durante 20 minutos y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Para los estudios de la eficacia letal de los PEAV en presencia de los antimicrobianos nisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y etil lauroil arginato (LAE[®]) (Vedeqsa, Terrasa, España) se adicionaron distintos volúmenes de soluciones madre de nisina o de LAE al tampón McIlvaine estéril para obtener medios de tratamiento con concentraciones de 100 y 200 µg/mL de nisina o de 25 y 50 µg/mL de LAE. Las soluciones madre de nisina y LAE se prepararon adicionando 20 mg de nisina o 105 mg de LAE en 10 mL de agua destilada estéril. Los medios de

tratamiento adicionados con antimicrobianos se prepararon inmediatamente antes de cada tratamiento de PEAV.

Para los estudios de los tratamientos PEAV en flujo continuo, se utilizó zumo de manzana de la marca Auchan (Alcampo S.A., España). El pH del zumo fue de $3,5 \pm 0,1$ y su conductividad eléctrica variaba entre 0,25 y 0,3 S/m. Cuando se investigó el efecto del LAE en flujo continuo, se adicionaron 50 $\mu\text{g/mL}$ de LAE al zumo de manzana previamente al tratamiento de PEAV.

3.2. MICROORGANISMOS

Para llevar a cabo esta investigación, se utilizaron cepas de las siguientes especies microbianas: *Listeria monocytogenes* (CECT 932, CECT 4031, CECT 4032, CECT 5366, CECT 5672), *Staphylococcus aureus* (CECT 976, CECT 4465, CECT 4630, CECT 4459, CECT 4466), *Salmonella* Typhimurium (CECT 443, CECT 722, CECT 880, CECT 878, CECT 4594) y *Escherichia coli* (CECT 471), suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), O157:H7, BJ4 y BJ4L1 (Krogfelt *et al.*, 2000) amablemente proporcionadas por el Doctor Mackey de la Universidad de Reading. Todas las cepas fueron conservadas durante la investigación en crioviales (Maintenance Freeze Medium 064-TA0124, Scharlau Chemie, Sentmenat, España) a -80°C (Ultra Low Temperature Freezer MDF-U32865, SANYO Electric, Osaka, Japón).

3.2.1. OBTENCIÓN DE LAS SUSPENSIONES

Las suspensiones se prepararon siguiendo las etapas que se muestran en la Figura 3.1. En la Tabla 3.1 se resumen los diferentes medios, temperaturas y tiempos de cultivo utilizados para cada uno de los microorganismos.

Todos los cultivos fueron suministrados en forma de liofilizado y se revitalizaron en los medios recomendados por la CECT. A partir de los precultivos revitalizados, se sembraron placas de agar por agotamiento en estría. Los correspondientes crioviales se inocularon con una colonia aislada de la estría. A partir de ellos, se sembraron semanalmente placas de agar por agotamiento en estría

durante todo el periodo de realización de la investigación, con objeto de disponer de cultivo fresco.

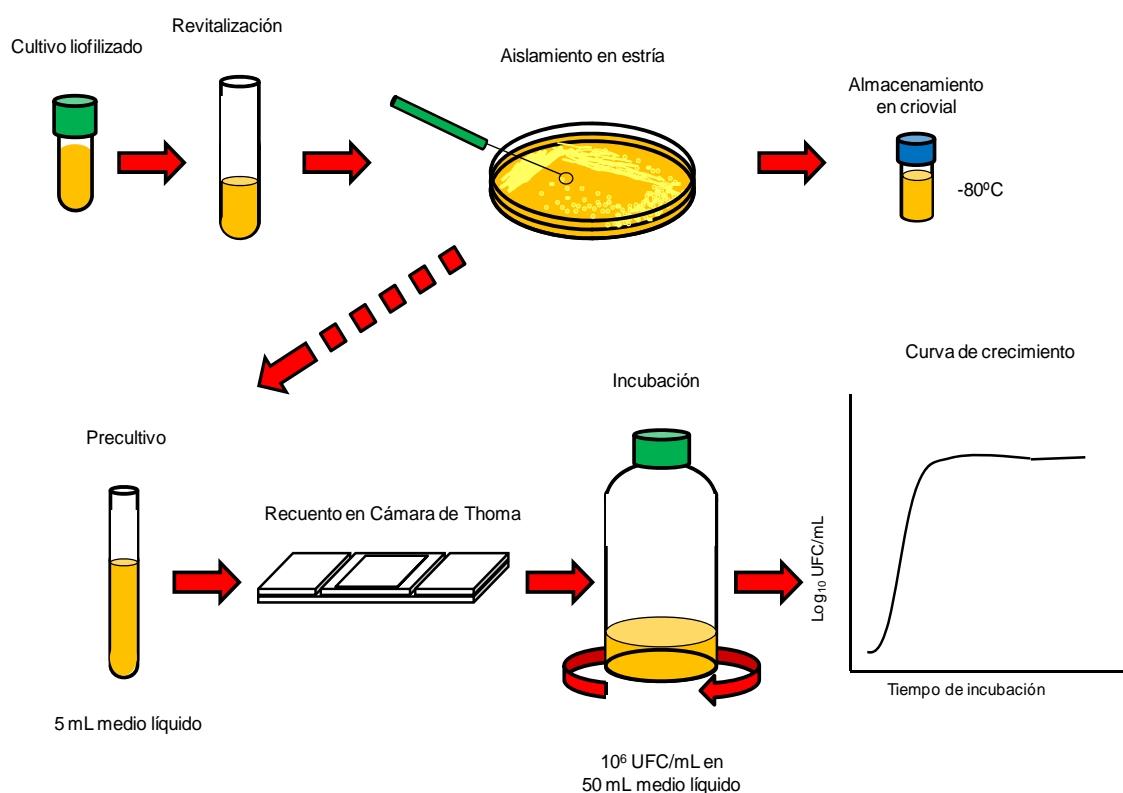


Figura 3.1. Esquema general para la obtención de suspensiones microbianas.

Para la preparación de las suspensiones, a partir de una colonia aislada de las placas almacenadas, se sembraron tubos de ensayo que contenían 5 mL de caldo estéril. Estos precultivos, se incubaron en estufa durante 18 horas (Hotcold UL, Selecta, Abrera, España). Tras determinar la concentración celular de los precultivos mediante recuento microscópico (microscopio L-Kc, Nikkon, Tokio, Japón) en cámara de Thoma (ServiQuimía, Constantí, España), se inocularon frascos con 50 mL de TSB+YE estéril atemperado a la temperatura de incubación, con una concentración microbiana inicial de 10^6 UFC/mL. Los cultivos se incubaron en estufa (Hotcold UL) en agitación (agitador Vibramax 100, Heidolph Instruments, Acwabach, Alemania) a las temperaturas y tiempos indicados en la Tabla 3.1. El tiempo de incubación necesario para que las suspensiones alcanzaran la fase de crecimiento estacionario se estableció a partir de curvas de crecimiento como las que se muestran en la Figura 3.2, a modo de ejemplo, para los microorganismos *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 5672, *Salmonella* Typhimurium 878 y *S. aureus* 4459.

Tabla 3.1. Medios, temperaturas y tiempos de cultivo de las distintas etapas de preparación de las suspensiones microbianas.

<i>Microorganismo</i>	<i>Revitalización (TSB+YE)^a</i>	<i>Aislamiento (TSA+YE)^b</i>	<i>Precultivo (TSB+YE)^a</i>	<i>Cultivo (TSB+YE)^a</i>
<i>E. coli</i> 471	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>E. coli</i> W3110	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>E. coli</i> O157:H7	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>E. coli</i> BJ4	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>E. coli</i> BJ4L1	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>Salmonella</i> Typhimurium 443	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>Salmonella</i> Typhimurium 722	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>Salmonella</i> Typhimurium 880	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>Salmonella</i> Typhimurium 878	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>Salmonella</i> Typhimurium 4594	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>L. monocytogenes</i> 5366	37°C/24 h	37°C/30 h	37°C/18 h	37°C/30 h
<i>L. monocytogenes</i> 4031	37°C/24 h	37°C/30 h	37°C/18 h	37°C/30 h
<i>L. monocytogenes</i> 5672	37°C/24 h	37°C/30 h	37°C/18 h	37°C/30 h
<i>L. monocytogenes</i> 4032	37°C/24 h	37°C/30 h	37°C/18 h	37°C/30 h
<i>L. monocytogenes</i> 932	37°C/24 h	37°C/30 h	37°C/18 h	37°C/30 h
<i>S. aureus</i> 976	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>S. aureus</i> 4465	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>S. aureus</i> 4630	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>S. aureus</i> 4459	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h
<i>S. aureus</i> 4466	37°C/24 h	37°C/24 h	37°C/18 h	37°C/24 h

^aTSB+YE: caldo tripticasa-soja con 0.6% de extracto de levadura.

^bTSA+YE: agar tripticasa-soja con 0.6% de extracto de levadura.

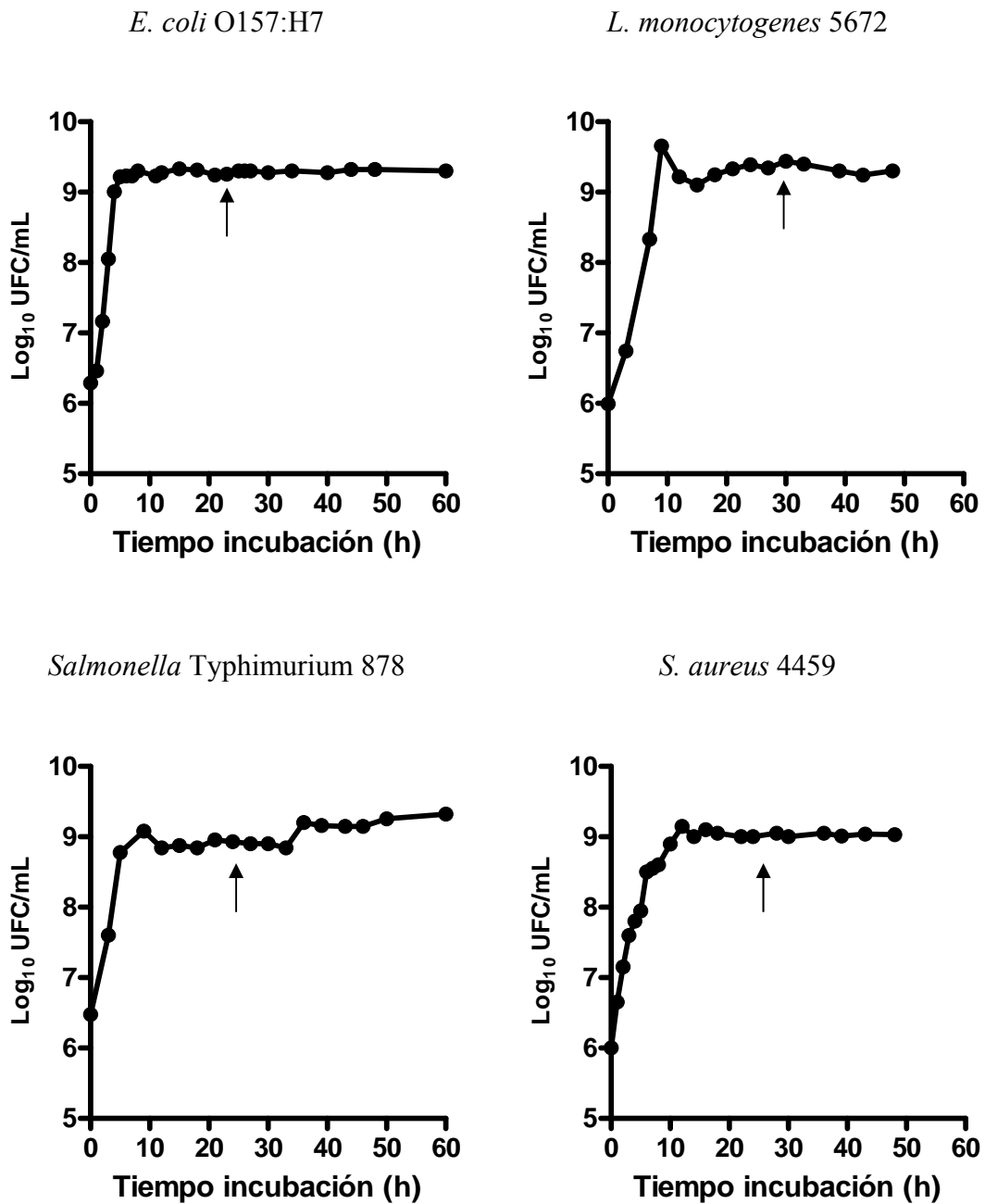


Figura 3.2. Ejemplos de curvas de crecimiento de cada una de las especies microbianas utilizadas en esta Tesis Doctoral. Las flechas indican el tiempo de incubación establecido para los experimentos de PEAV.

3.2.2. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para elaborar las curvas de crecimiento, a intervalos predeterminados de tiempo, se tomaron 0,1 mL de los frascos que contenían las suspensiones

microbianas. Tras realizar las correspondientes diluciones decimales en caldo estéril, se sembraron alícuotas de 0,1 mL, por duplicado, en placas de Petri, por homogeneización en masa. Los caldos y temperaturas de incubación, así como los medios, tiempos y temperaturas de recuperación utilizados fueron los mismos que los indicados en la Tabla 3.1. Las curvas de crecimiento se elaboraron representando el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL frente al tiempo de incubación en horas (Figura 3.2). Para el recuento microbiano, se utilizó un contador automático de colonias (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Inglaterra).

Todas las investigaciones se realizaron con células en la fase de crecimiento estacionario dado que es en esta fase de crecimiento en la que las células son más resistentes a los PEAV (Cebrián *et al.*, 2007).

3.3. TRATAMIENTOS DE PEAV

Para la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizaron dos tipos distintos de generadores de PEAV uno de caída exponencial y otro de onda cuadrada. El equipo de onda cuadrada se adquirió para la realización de esta investigación y se utilizó para la aplicación de tratamientos en condiciones estáticas y y en flujo continuo. Los tratamientos en estático se aplicaron con la cámara habitualmente utilizada en nuestro laboratorio y con una cámara, desarrollada durante esta Tesis Doctoral, con los electrodos termostatados. A continuación, se describen los generadores y las cámaras de tratamiento así como las condiciones de tratamiento utilizadas en esta Tesis Doctoral con cada una de las configuraciones disponibles.

3.3.1. GENERADOR DE PEAV

3.3.1.1. GENERADOR DE PULSOS ELÉCTRICOS DE CAÍDA EXPONENCIAL

Debido a que cuando se inició esta Tesis Doctoral aún no se había adquirido el equipo de PEAV de onda cuadrada, para la realización del primer estudio, en el que se comparó la resistencia a los PEAV de las 20 cepas investigadas, se utilizó el

equipo de caída exponencial disponible en nuestro laboratorio, que fue construido en colaboración con el *Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering* de la Universidad Técnica de Berlín (Heinz *et al.*, 2003). En la Figura 3.3, se muestra la configuración eléctrica general de este equipo, que consta de un generador de corriente continua (HCK 2500 M35000, F.U.G. Elektronik GmbH, Rosenheim, Alemania) capaz de transformar la corriente trifásica alterna (0,38 kV; 16 A) en continua de hasta una intensidad máxima de 140 mA y un voltaje máximo de 35 kV. Este generador carga un set de 5 condensadores (C-20C682, Behlke, Kronberg, Alemania) que poseen una capacidad individual de 6800 pF y que soportan un voltaje máximo de 20 kV. Finalmente, el sistema dispone de un interruptor tipo tristor (HTS 160-500 SCR, Behlke) que permite la descarga completa de la energía eléctrica almacenada en los condensadores en la cámara de tratamiento. Este interruptor posee un voltaje y un amperaje máximos de trabajo de 16 kV y 5kA, respectivamente. La apertura del interruptor está regulada por una señal eléctrica externa de 5 V suministrada por un generador de funciones (AGF 320, Tektronix). Una vez abierto, se produce la descarga completa y no regulada de la energía almacenada, por lo que se generan pulsos de caída exponencial. Como sistema de protección del interruptor, para impedir el reflujó de energía eléctrica al mismo, entre él y la cámara de tratamiento se sitúan un diodo (FDA 200-150, Behlke) y tres resistencias eléctricas de 15 Ω cada una (886AS150LDS, Cesiwid, Niagara Falls, EE.UU.).

El sistema descrito permite la aplicación de pulsos de caída exponencial de aproximadamente 4 μ s de anchura de hasta 16 kV y 5 kA, a unas frecuencias de hasta 60 Hz.

Todo el equipo está controlado mediante un software diseñado en la Universidad Técnica de Berlín mediante la herramienta de programación TestPoint (Capital Equipment, Billerica, Massachusetts, EE.UU.).

Para determinar el voltaje y la intensidad de corriente aplicados, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix) y una sonda de intensidad (Stangenes Industries) cuyas lecturas son registradas en un osciloscopio digital de dos canales (TDS 3012B, Tektronix) que, a su vez, dispone de una herramienta de integración que permite calcular la energía aplicada por pulso.

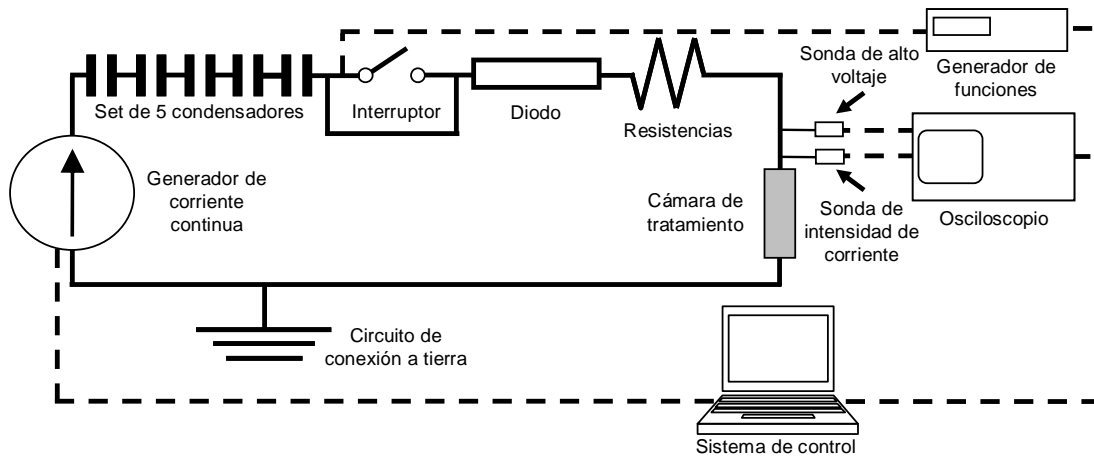


Figura 3.3. Configuración eléctrica del equipo de PEAV de caída exponencial.

Condiciones de tratamiento: utilizando este equipo, se aplicaron 50 pulsos de caída exponencial de intensidades de campo eléctrico de 20 kV/cm (1,7 kJ/Kg), 25 kV/cm (2,7 kJ/Kg) y 30 kV/cm (3,6 kJ/Kg) a una frecuencia de 1 Hz, utilizando para ello una cámara estática de electrodos paralelos sin termostatar, cuyas características se describen más adelante, en el apartado 4.3.2.1.

3.3.1.2. GENERADOR DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ONDA CUADRADA

El equipo consiste en un generador de pulsos eléctricos suministrado por la empresa ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia), cuyo esquema eléctrico se muestra en la Figura 3.4. Éste consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, ScandiNova) que convierte la corriente trifásica alterna (380 V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie (Switch rack SR-6, ScandiNova). Una señal eléctrica externa (TTL, 5 V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal pulsante de onda cuadrada. Finalmente, un transformador de pulsos (Pulse transformer, ScandiNova) convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada.

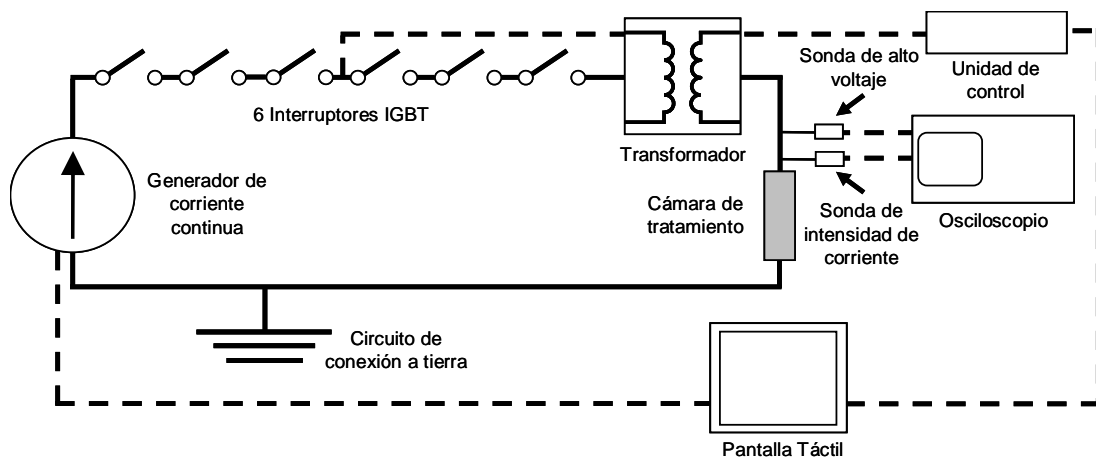


Figura 3.4. Configuración eléctrica del equipo de PEAV de onda cuadrada.

Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3 μs de duración y de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz.

El equipo está diseñado para trabajar con una cámara de tratamiento con una resistencia eléctrica óptima entre 100 y 170 Ω . En estas condiciones, se consigue un pulso totalmente cuadrado (Figura 3.5B), en el que el voltaje aumenta hasta el valor establecido a una velocidad de 47 kV/ μs y, una vez terminado el pulso, la velocidad de descenso es de 56 kV/ μs . A lo largo de toda la duración del pulso, el voltaje alcanzado oscila menos de un 2%. Cuando la resistencia eléctrica de la cámara es menor de 100 Ω (Figura 3.5A) o mayor de 170 Ω (Figura 3.5C) la forma del pulso deja de ser cuadrada, por lo que el control de los parámetros del proceso (intensidad del campo eléctrico, tiempo de tratamiento y energía específica) es menos preciso. La necesidad de trabajar en un rango determinado de resistencia eléctrica condiciona las dimensiones de las cámaras de tratamiento en estático y en flujo continuo en función de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento, como se verá posteriormente.

Durante la aplicación de los tratamientos, parte de la energía eléctrica generada se disipa en forma de calor. Para evitar el sobrecalentamiento del sistema, el equipo posee un sistema de refrigeración mediante aceite dieléctrico de baja conductividad eléctrica. Dicho aceite es enfriado mediante un intercambiador de calor en el que el fluido refrigerante es agua. Ésta debe circular a un flujo mínimo de 9 L/min, a una presión de entre 3 y 8 bares, y su temperatura debe estar comprendida entre 10 y

40°C. Para que las condiciones de trabajo del equipo sean estables, la temperatura del agua durante la aplicación de los tratamientos debe ser igual a su temperatura inicial $\pm 2,5^\circ\text{C}$.

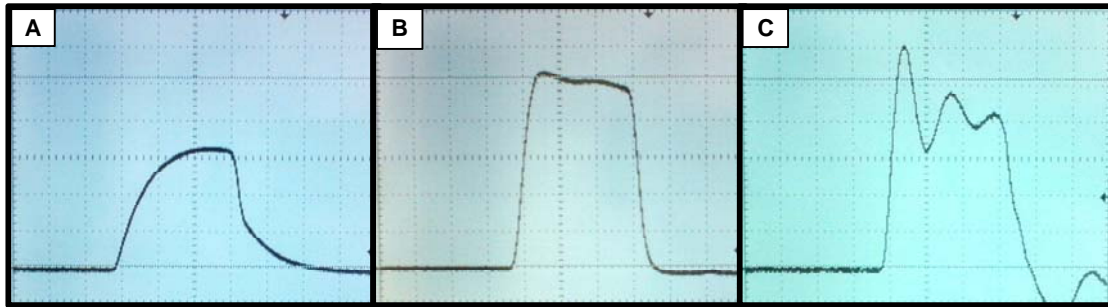


Figura 3.5. Imágenes de la forma real de varios pulsos registradas por el osciloscopio conectado a la sonda de alto voltaje. Resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento: A=60 Ω ; B=130 Ω ; C=350 Ω .

El control del equipo se realiza mediante un software específico diseñado por la empresa fabricante (K1-15m, ScandiNova) manejable mediante una pantalla táctil de cristal líquido (Simatic panel, Siemens, Munich, Alemania). Debido a que el equipo aplica altos voltajes e intensidades de corriente, se integró un sistema de seguridad que permite la desconexión manual del circuito eléctrico en caso de emergencia. Éste consta de un pulsador externo de fácil accionamiento (RS Amidata, Pozuelo de Alarcón, España), conectado al equipo mediante una clavija tipo RS-232 (RS Amidata). Al accionar el pulsador, el circuito se cierra impidiendo el paso de corriente a través de él, de modo que la manipulación de sus componentes externos sea segura.

Para determinar el voltaje e intensidad de corriente realmente aplicados y así conocer las condiciones efectivas de tratamiento, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix, Wilsonville, Oregon, EE.UU.) y una sonda de intensidad de corriente (Stangenes Industries, Palo Alto, California, EE.UU.) conectadas a la salida del equipo, cuyas lecturas son registradas en un osciloscopio digital de dos canales (TDS 220, Tektronix).

Para la realización de la mayor parte de esta Tesis Doctoral, se utilizó el equipo de pulsos eléctricos de onda cuadrada, aplicando los tratamientos en condiciones estáticas o en flujo continuo. La principal diferencia entre ambas configuraciones radica, básicamente, en el tipo de cámara de tratamiento utilizada: cámara de tratamiento estática o cámara de tratamiento en flujo continuo.

3.3.2. CÁMARAS DE TRATAMIENTO

3.3.2.1. CÁMARAS DE TRATAMIENTO ESTÁTICAS

En las primeras investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral, se trabajó con una *cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos* que ya ha sido descrita con anterioridad por Raso *et al.* (2000). Sus principales características se resumen en la Tabla 3.2. Ésta consiste en un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable de 16 mm de diámetro (Figura 3.6). Estas tres estructuras delimitan la zona de tratamiento. Como ya ha sido comentado en el apartado 1.1.3.2.2 de la Introducción de esta Tesis Doctoral, el diseño de electrodos paralelos permite la aplicación de un campo eléctrico uniforme. Para mejorar esta distribución uniforme y además evitar la posible presencia de aire ocluido, la superficie de los electrodos está pulida a espejo. Uno de los electrodos está conectado a tierra, mientras que el otro está conectado al alto voltaje generado por el equipo de PEAV. Para la realización de los experimentos, se ajustó la distancia de los electrodos a 2,5 mm por lo que el volumen de tratamiento fue de 0,5 mL. Con objeto de llenar y vaciar la cámara fácilmente, ésta dispone de un orificio en el tubo de polietileno de 1,0 mm de diámetro. Durante el tratamiento, el orificio se mantiene cerrado mediante cinta adhesiva tipo cello.

Si bien la utilización de este diseño de cámara de tratamiento permite aplicar un campo eléctrico uniforme en todo el volumen de la muestra, la temperatura del medio de tratamiento varía con la aplicación de PEAV. En estas investigaciones utilizando este diseño, la temperatura del medio osciló entre los 24 y los 35°C.

Tabla 3.2. Características principales de la cámara estática de electrodos paralelos utilizada en esta Tesis Doctoral.

<i>Cámara estática</i>	
Distancia entre los electrodos	2,5 mm
Diámetro zona de tratamiento	16 mm
Volumen total de tratamiento	0,5 mL
Campo eléctrico máximo	35 kV/cm

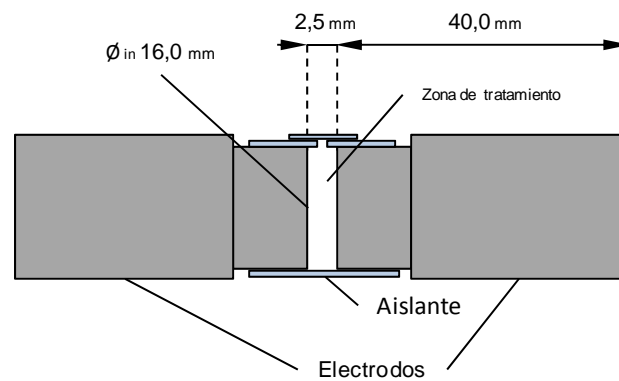


Figura 3.6. Esquema de la cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos.

En investigaciones posteriores, con objeto de tener un mayor conocimiento de la influencia de la temperatura del medio en la eficacia letal de los PEAV, se construyó una nueva *cámara estática de electrodos paralelos termostata* cuyo diseño estaba basado en la anteriormente descrita. La cámara consiste en un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable de 16 mm de diámetro y 4 cm de longitud, separados una distancia de 2,5 mm. El interior de los electrodos es hueco, lo que permite la circulación de aceite dieléctrico ($1,4 \mu\text{S}/\text{cm}$) atemperado a diferentes temperaturas (Figura 3.7). El aceite se impulsa con una bomba peristáltica a un caudal de 5 L/h que, previamente a su paso por los electrodos, se atempera haciéndolo circular por el interior de un serpentín de acero inoxidable ($\text{Ø}_{\text{interno}}$ 2 mm, $\text{Ø}_{\text{externo}}$ 3mm, 200 cm longitud) que está sumergido en un baño termostático. Este sistema permite atemperar el medio de tratamiento a distintas temperaturas y evita que la temperatura del medio de tratamiento apenas incremente durante la aplicación de los PEAV.

Al igual que en la cámara anterior, su llenado y vaciado se realiza a través de un orificio en el tubo de polietileno de 1,0 mm de diámetro, el cual se mantiene cerrado durante el tratamiento con cinta adhesiva tipo cello.

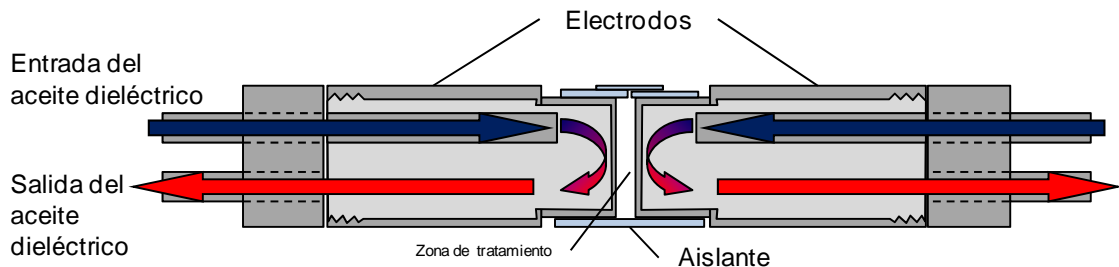


Figura 3.7. Esquema de la cámara de tratamiento estática con electrodos paralelos termostatados. Las flechas indican la dirección y el sentido del flujo del aceite dieléctrico por el interior de los electrodos. Separación entre electrodos: 2,5 mm; Longitud del electrodo: 40,0 mm; Diámetro del electrodo: 16,0 mm.

3.3.2.1.1. Sistema de medida de la temperatura durante los tratamientos de PEAV en estático

El sistema de medida de la temperatura del medio de tratamiento para cualquiera de los dos tipos de cámaras de tratamiento tras la aplicación de PEAV en condiciones estáticas se realizó mediante una sonda termopar K (Alhorn, Holzikirchen, Dinamarca), accionada por un sistema neumático descrito previamente por Raso *et al.* (2000). El dispositivo consta de un termopar tipo K cuya sonda tiene una longitud de 150 mm y cuyos últimos 10 mm tienen un diámetro de 0,9 mm. Su precisión es de $\pm 0,2$ °C (-20 a +70°C) y su velocidad de respuesta de 0,5 s (Testo GmbH, Lenzkirch, Alemania). El termopar se encuentra alojado en una carcasa de metacrilato que dispone de un muelle y una cámara herméticamente cerrada que se puede presurizar. La cámara se presuriza con nitrógeno seco y el paso del nitrógeno a la cámara presurizada está regulado por una válvula solenoide. Finalizado el tratamiento, se acciona la válvula solenoide permitiendo el paso de nitrógeno a la cámara presurizada. La presión comprime el muelle y el termopar penetra rápidamente en el interior de la cámara de tratamiento por el orificio de llenado (Figura 3.8). Una vez medida la temperatura, la válvula solenoide cierra el paso del gas y el termopar vuelve a su posición inicial empujado por el muelle. Con este

dispositivo, se puede conocer la temperatura del medio de tratamiento tras un número determinado de pulsos sin que el campo eléctrico interfiera en la medida de la temperatura y sin que el sensor interfiera en la distribución del campo eléctrico.

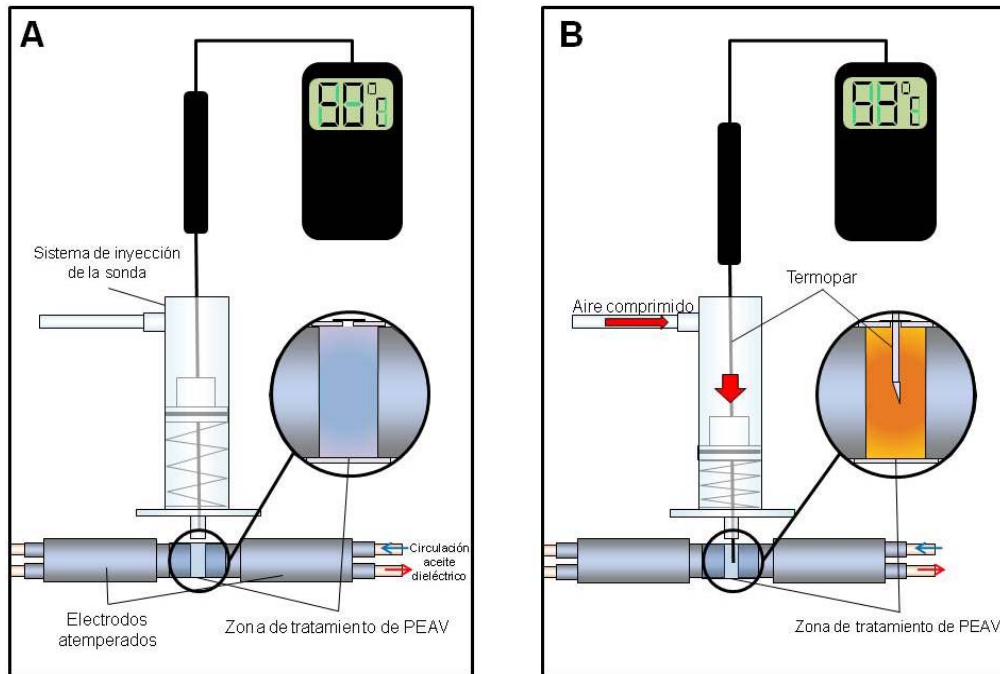


Figura 3.8. Procedimiento para la medida de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de un tratamiento de PEAV. A: Estado de reposo; B: Accionamiento neumático del sistema tras la finalización el tratamiento.

3.3.2.1.2. Evaluación del funcionamiento de la cámara de electrodos termostatados

Con el fin de evaluar el comportamiento del sistema de termostatación diseñado, se realizaron una serie de pruebas preliminares, que se resumen a continuación. La Figura 3.9 compara la evolución de la temperatura del medio de tratamiento al aplicar tratamientos PEAV de distinta intensidad del campo eléctrico en una cámara con y sin electrodos termostatados. Como se observa, hay una clara diferencia en la evolución de la temperatura en ambas cámaras de tratamiento. Tras la aplicación de 50 pulsos de 3 μ s, la temperatura aumentó 9,5°C en la cámara no termostatada y sólo 3,8°C en la cámara con electrodos termostatados, a la máxima intensidad del campo eléctrico ensayada (30 kV/cm). Estos resultados confirman que la circulación de aceite dieléctrico a través de los electrodos permite minimizar el incremento de la temperatura del medio de tratamiento durante los tratamientos de PEAV.

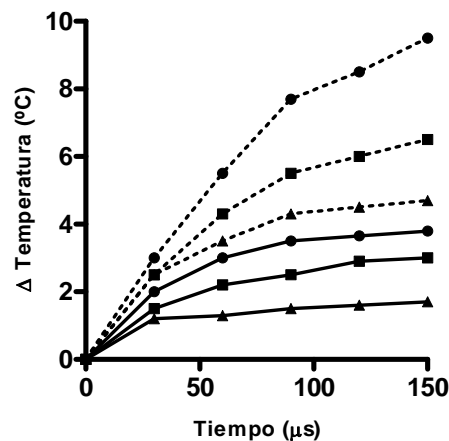


Figura 3.9. Comparación de la evolución de la temperatura del medio de tratamiento en una cámara de tratamiento sin electrodos termostatados (líneas discontinuas) y con electrodos termostatados (líneas continuas) a distintas intensidades del campo eléctrico: 20 kV/cm (▲), 25 kV/cm (■) y 30 kV/cm (●). Frecuencia del tratamiento: 0,5 Hz.

La Figura 3.10 muestra la evolución de la temperatura del medio de tratamiento durante la aplicación de tratamientos PEAV de 30 kV/cm a distintas temperaturas iniciales. Según esta figura, con la cámara de electrodos termostatados es posible aplicar tratamientos PEAV a distintas temperaturas. Además, el incremento de temperatura durante los tratamientos PEAV fue siempre menor a 4°C incluso tras las condiciones de tratamiento más intensas aplicadas con esta cámara: 50 pulsos de 3 μs a 30 kV/cm.

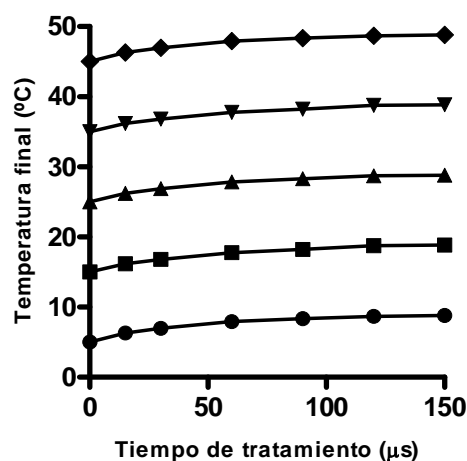


Figura 3.10. Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a temperaturas iniciales de 5°C (●), 15°C (■), 25°C (▲), 35°C (▼) y 45°C (◆) utilizando la cámara de electrodos paralelos termostatada. Condiciones de tratamiento: 30kV/cm; 0,5 Hz, anchura de pulso de 3 μs.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se utilizó como tratamientos de PEAV más intensos a aplicar con la cámara de electrodos termostatados para los estudios de inactivación microbiana, la aplicación de 30 kV/cm y 100 μ s de tiempo de tratamiento con el fin de minimizar la variación de la temperatura del medio de tratamiento. En todos los casos, la frecuencia de aplicación de los pulsos fue de 0,5 Hz ya que como muestra la Figura 3.11 es la que produjo el menor incremento de la temperatura del medio.

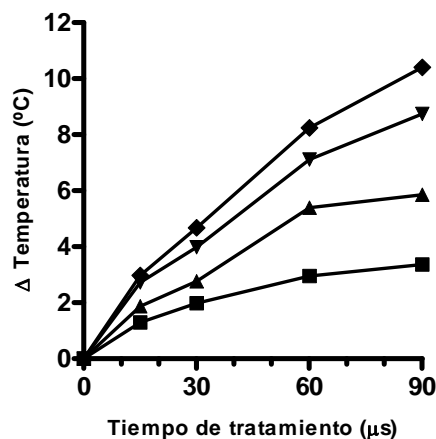


Figura 3.11. Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a 0,5 Hz (■), 1 Hz (▲), 2 Hz (▼) y 3 Hz (◆). Condiciones de tratamiento: 30kV/cm; 3 μ s de anchura de pulso.

3.3.2.2. CÁMARAS DE TRATAMIENTO EN FLUJO CONTINUO

Para realizar los estudios de la eficacia letal de los PEAV en flujo continuo, se utilizó una cámara de electrodos paralelos cuyas características principales se muestran en la Tabla 3.3. Esta cámara está basada en un diseño desarrollado en la Universidad Técnica de Berlín (Ulmer *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2003; Puértolas *et al.*, 2008) y su esquema básico se muestra en la Figura 3.12. Partiendo de este diseño, la cámara utilizada se dimensionó considerando la conductividad eléctrica del medio de tratamiento con el que se iba a trabajar (zumo de manzana de 0,25-0,30 S/m), el rango de resistencias eléctricas óptimas de la cámara de tratamiento (entre 100 y 170 Ω), la máxima intensidad de corriente que permite trabajar el generador de PEAV (200 A) y la máxima frecuencia de aplicación de los pulsos (300 Hz).

La cámara de tratamiento consta de dos electrodos planos de acero inoxidable separados 4,5 mm por una pieza aislante de Teflón. Uno de los electrodos está conectado a la señal pulsante de alto voltaje generada por el equipo de pulsos de onda cuadrada anteriormente descrito, mientras que el otro está conectado a tierra. Esta configuración crea una zona de tratamiento de sección cuadrada de una anchura de 4,5 mm, una altura de 3,7 mm y una longitud de 4 cm en la que el campo eléctrico generado es perpendicular a la dirección de flujo del producto. El volumen total de tratamiento es de 0,67 mL. Utilizando un flujo de producto de 3 L/h, el tiempo de residencia medio del producto en la zona de tratamiento es de 0,8 s. En estas condiciones, el número máximo de pulsos que es posible aplicar es de 42. Según los límites máximos de voltaje y de intensidad de corriente del generador de PEAV (30 kV y 200 A), el campo eléctrico máximo que se podría aplicar para tratar el zumo de manzana de 0,25-0,30 S/m es de 60 kV/cm, aunque en esta investigación nunca fue mayor de 30 kV/cm.

Tabla 3.3. Características principales de la cámara de electrodos paralelos en flujo continuo utilizada en esta Tesis Doctoral.

<i>Cámaras de Electrodo Paralelos</i>	
Distancia entre los electrodos	4,5 mm
Longitud del electrodo	4 cm
Área de tratamiento	1,47 cm ²
Volumen total de tratamiento	0,67 mL
Tiempo de residencia	0,8 s
Rango de conductividad	1,5 a 3,5 mS/cm
Campo eléctrico máximo	60 kV/cm
Caudal máximo	21 L/h
Número de pulsos máximo	42 pulsos de 3μs

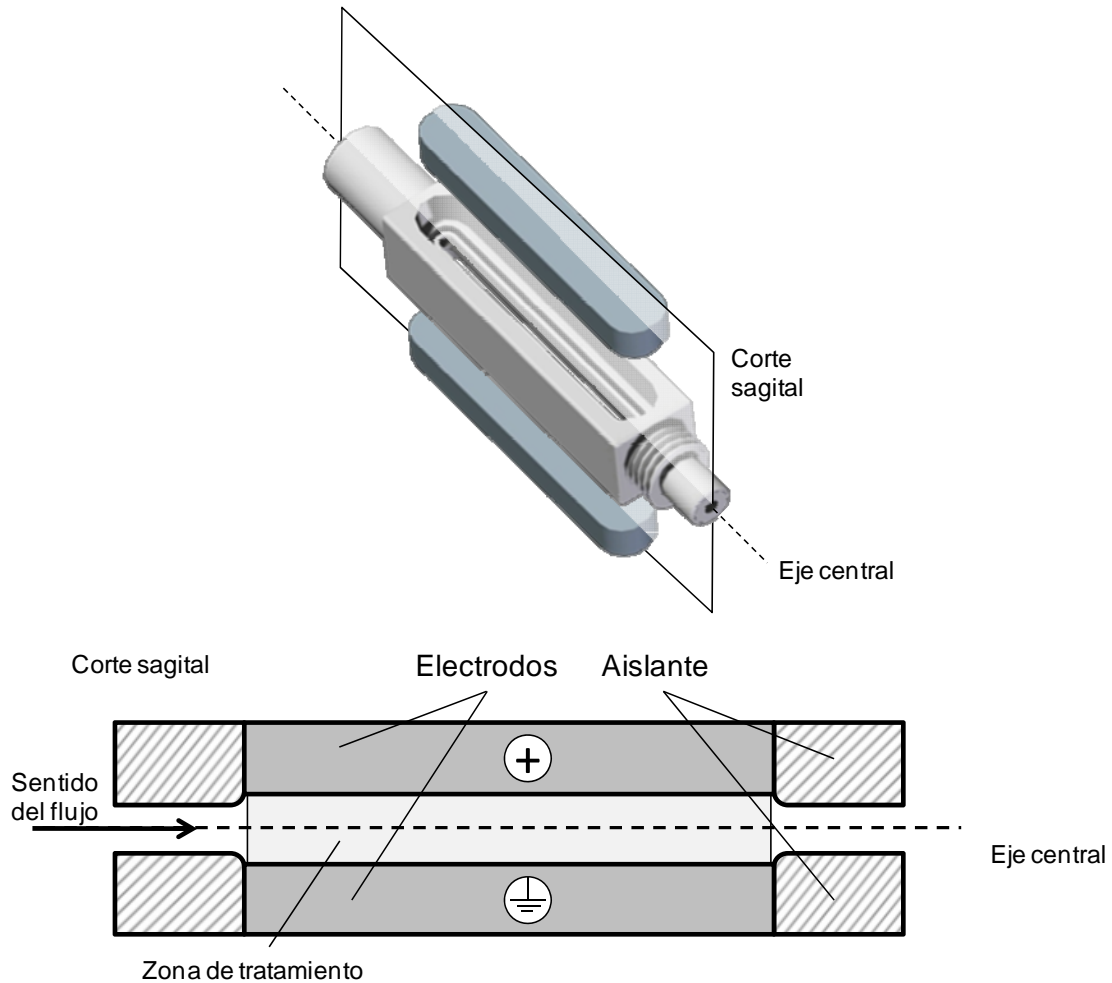


Figura 3.12. Esquema básico de la cámara de electrodos paralelos utilizada en esta Tesis Doctoral. Separación entre electrodos: 4,5 mm; Longitud del electrodo: 40,0 mm.

Como ya se ha comentado en el apartado 1.1.3.2.2.2 de la Introducción, el diseño de la cámara de tratamiento es un factor que condiciona la distribución del campo eléctrico en la zona de tratamiento y, por tanto, la uniformidad del tratamiento de PEAV aplicado. Por ello, se ha evaluado la homogeneidad del campo eléctrico en la cámara de electrodos paralelos utilizada en los tratamientos en flujo continuo. Para tal fin, se utilizó el software Comsol Multiphysics[®] (Comsol, Estocolmo, Suecia) que permite realizar cálculos de simulación numérica mediante el método de elementos finitos (MEF). Como ya se ha comentado en la Introducción, la simulación numérica mediante MEF, es una herramienta ampliamente utilizada para conocer los valores de determinadas variables físicas, en sistemas en los cuales es imposible obtener la medida real de las mismas por medio de sensores así como para el estudio y

optimización de procesos a nivel industrial (Gerlach *et al.*, 2008). Este método matemático se basa en dividir el cuerpo o estructura (denominada “dominio”) en una serie de subdominios no intersectantes entre sí denominados “elementos finitos”. Dentro de cada elemento, se distinguen una serie de puntos denominados “nodos” que unidos entre sí forman una malla. Una serie de ecuaciones integrales, las denominadas “ecuaciones de gobierno”, definen el dominio. Éstas se resuelven en cada uno de los nodos, interpolándose el resultado al resto de la estructura. El sistema queda finalmente completado por una serie de condiciones de contorno en cada uno de los límites del dominio (Ferziger y Peric, 2002).

En la Tabla 3.4, se muestra la ecuación de gobierno utilizada en la simulación numérica del campo eléctrico así como las condiciones de contorno de los diferentes límites del dominio utilizadas para la resolución de la ecuación de gobierno.

Tabla 3.4. Ecuación de gobierno y condiciones de contorno utilizadas en la simulación numérica del campo eléctrico en el interior de la cámara de electrodos paralelos utilizados en esta Tesis Doctoral. σ : conductividad eléctrica (S/m); V : voltaje seleccionado (V); V_0 : voltaje inicial; J^e : densidad de corriente (A/m^2); r : radio.

Ecuación de Gobierno	Límite	Condiciones de contorno
$-\nabla \cdot (\sigma \nabla V - J^e) = 0$	Electrodo de alto voltaje	$V=V_0$
	Electrodo de tierra	$V=0$
	Aislante eléctrico	$n \sigma \nabla V = 0$
	Eje axial	$r = 0$

La Figura 3.13 muestra la distribución del campo eléctrico en la zona de tratamiento de la cámara utilizada en esta investigación y el valor de la intensidad del campo eléctrico eje axial de la misma entre los puntos A y B indicados en la figura durante la aplicación de un pulso eléctrico cuadrado de 3 μ s de anchura y 15 kV de amplitud. Como se observa, la distribución del campo eléctrico en toda la zona

de tratamiento es prácticamente uniforme. Únicamente, en los puntos de contacto entre los electrodos y el aislante se producía un incremento de la intensidad del campo eléctrico. Esta simulación muestra que con la cámara de electrodos paralelos utilizada se consigue que prácticamente todo el volumen de producto que circula por la cámara de tratamiento reciba la misma intensidad de campo eléctrico. Solo en un pequeño volumen el producto recibe un tratamiento más intenso.

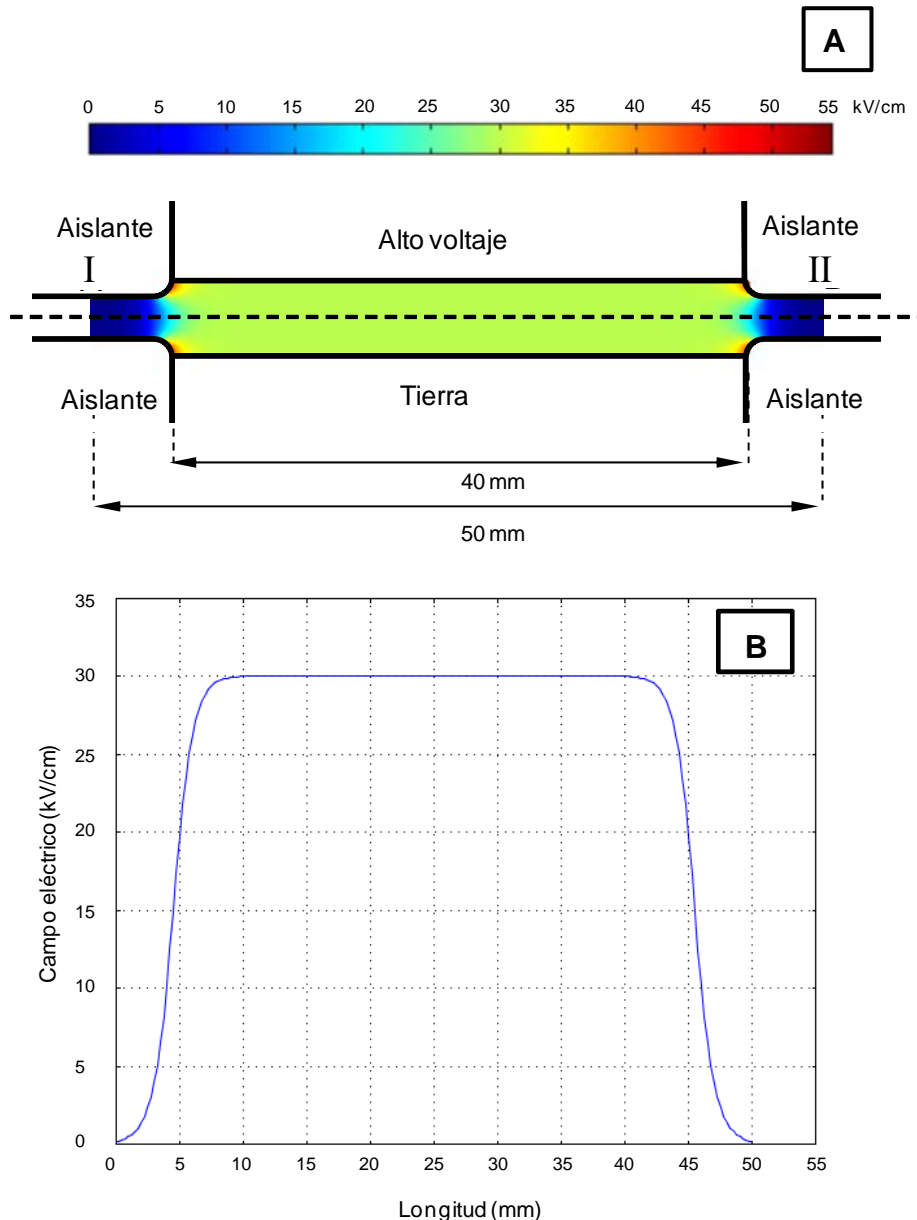


Figura 3.13. Simulación numérica de la distribución del campo eléctrico (kV/cm) en la cámara de tratamiento utilizada en esta investigación (cortetransversal) (A) y estimación de la intensidad del campo eléctrico (B) entre los puntos I y II durante la aplicación de un pulso de 3 μ s de anchura y de 15 kV de amplitud.

3.3.2.2.1. Configuración del equipo para el tratamiento en flujo continuo

La instalación para la aplicación de los tratamientos de PEAV en flujo continuo consistió en un depósito de 2 L que contenía el medio de tratamiento (zumo de manzana), una bomba, un intercambiador de calor y la cámara de tratamiento (Figura 3.14). Una bomba peristáltica de ocho cabezales (Ismatec, Glattbrugg, Suiza) impulsaba el medio de tratamiento hacia el intercambiador de calor a través de un tubo de silicona de 3 mm de diámetro interno. El intercambiador de calor consistió en un tubo en espiral de acero inoxidable ($\text{Ø}_{\text{interno}}$ 2 mm, $\text{Ø}_{\text{externo}}$ 3mm, 230 cm longitud) sumergido en un baño termostático (modelo K12-mpc-NR, Huber, Offenburg, Alemania). Una vez atravesado el intercambiador, el producto atemperado circulaba hacia la cámara donde recibía el correspondiente tratamiento PEAV. El producto tratado se recogía inmediatamente en tubos Eppendorf estériles que se introducían en hielo.

La temperatura del medio de tratamiento se medía con sondas termopar tipo “K” (Testo GmbH, Lenzkirch, Alemania) colocadas a la entrada del intercambiador de calor y a la entrada y salida de la cámara de tratamiento, como se muestra en la Figura 3.14.

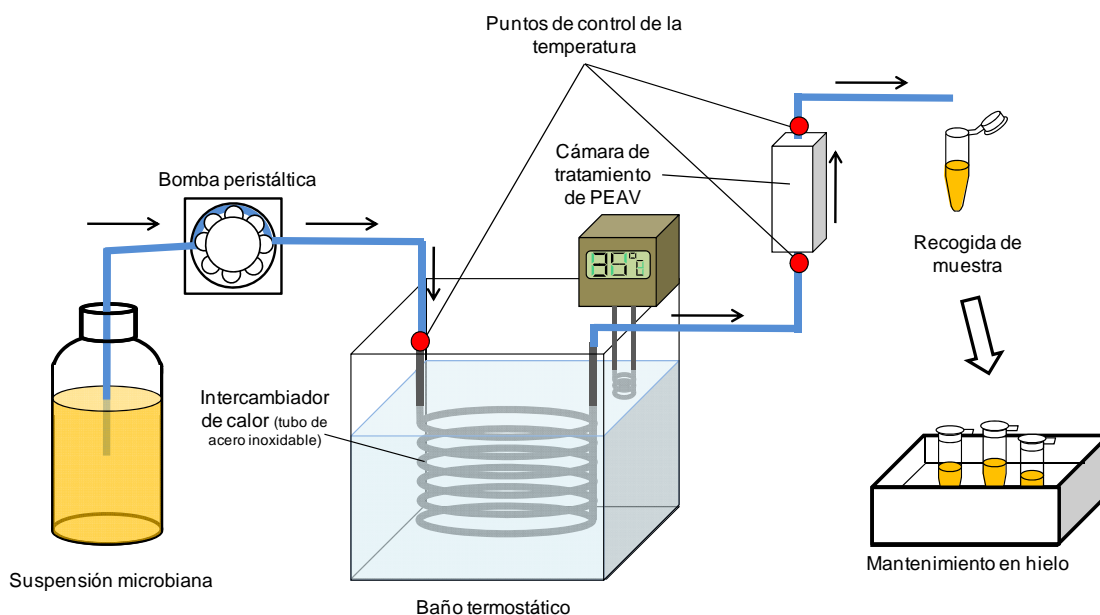


Figura 3.14. Esquema de la instalación para aplicar tratamientos de PEAV en flujo continuo.

3.3.3. CONDICIONES DE TRATAMIENTO DE PEAV

3.3.3.1. TRATAMIENTOS EN CONDICIONES ESTÁTICAS

Previamente a cada tratamiento de PEAV, la suspensión microbiana se centrifugó a 6000 x g durante 5 minutos a una temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (Minispin[®] plus, Eppendorf) y se resuspendió en el correspondiente medio de tratamiento. La suspensión microbiana resuspendida a una concentración de 10^8 UFC/mL, se introducía en la cámara para su tratamiento, mediante una jeringuilla estéril de 1 mL, como ha sido previamente descrito por Raso *et al.* (2000). Tras cada tratamiento, se extraía la muestra con una jeringuilla hipodérmica estéril y se realizaban diluciones decimales en agua de peptona al 0,1 % (p/v).

Condiciones de tratamiento de PEAV con la cámara sin sistema de termostatación: estas condiciones se corresponden con las investigaciones mostradas en los *manuscritos II y III*. Éstas consistieron en la aplicación de hasta 501 μs de intensidades del campo eléctrico de 15, 20, 25, 30 y 35 kV/cm que correspondían a energías específicas por pulso de 0,7, 1,2, 1,9, 2,7 y 3,7 kJ/kg, respectivamente. La frecuencia de aplicación de los pulsos fue de 1 Hz. Con estas condiciones, la temperatura al finalizar los tratamientos nunca superó los 35°C .

Condiciones de tratamiento de PEAV con la cámara termostatada: cuando se investigó el efecto de la temperatura del medio de tratamiento en la eficacia letal de los PEAV (*manuscrito IV*), se aplicaron tratamientos PEAV de hasta 150 μs a una intensidad del campo eléctrico de 30 kV/cm que correspondía a una energía específica por pulso de 2,7 kJ/kg. La frecuencia de aplicación de los pulsos fue de 0,5 Hz. Las temperaturas del medio de tratamiento investigadas fueron 4, 15, 28, 38 y 50°C .

En el caso de las investigaciones realizadas combinando los tratamientos PEAV en presencia de antimicrobianos en el medio de tratamiento a distintas temperaturas (*manuscritos V y VI*), se aplicó un tratamiento de PEAV de 30 kV/cm y 99 μs , que correspondía a una energía específica por pulso de 2,7 kJ/kg, a una frecuencia de 0,5 Hz. Las temperaturas del medio de tratamiento investigadas fueron 4, 27 y 50°C .

3.3.3.2. TRATAMIENTOS EN CONDICIONES DE FLUJO CONTINUO

Para los tratamientos en flujo continuo, se centrifugaron 200 mL de suspensión microbiana a 2750 x g durante 15 minutos a una temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y se resuspendieron en 2 L de zumo de manzana. El zumo inoculado con la suspensión microbiana a una concentración de 10^8 UFC/mL, se bombeaba hacia la cámara de tratamiento para recibir el correspondiente tratamiento de PEAV. Tras el mismo, se recogían 1 mL de muestra en tubos Eppendorf estériles que se sumergían inmediatamente en hielo

Condiciones de tratamiento de PEAV en flujo continuo: para las investigaciones mostradas en el *manuscrito VIII*, se aplicaron tratamientos de intensidades de campo eléctrico de 20, 25 y 30 kV/cm, a distintos tiempos de tratamiento que variaban entre 6 y 123 μs , modificando para ello la frecuencia de aplicación de los pulsos, desde 1 a 52 Hz, utilizando un caudal de 3 L/h. La temperatura inicial del medio de tratamiento a la entrada en la cámara de tratamiento se estableció a 20, 30 y 40°C . En estas condiciones de tratamiento de PEAV, la temperatura del medio de tratamiento a la salida de la cámara de tratamiento varió desde 24 a $60 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.4. INCUBACIÓN Y RECuento DE SUPERVIVIENTES

Tras realizar las correspondientes diluciones decimales de las muestras tratadas, se sembraban 0,1 mL en masa en placas de Petri a las que se les adicionaba TSA+EL. Tras la siembra, los microorganismos se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas para todas las cepas de *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium y *S. aureus*, y durante 48 horas para las cepas de *L. monocytogenes*. Tiempos más prolongados de incubación no afectaban al número de microorganismos recuperados tras el tratamiento.

3.4.1. Recuento de supervivientes

Los recuentos se efectuaron mediante un contador automático de colonias (mod. Protos, *Analytical Measuring Systems*, Cambridge, Reino Unido), adaptado

por nuestro grupo de investigación para el conteo de placas densamente pobladas (Condón *et al.*, 1996). Todos los estudios se realizaron al menos por duplicado.

3.4.2. Evaluación del daño subletal tras los tratamientos de PEAV

Con el fin de cuantificar el número de células dañadas subletalmente tras la aplicación del correspondiente tratamiento de PEAV, además de recuperar los microorganismos en TSA+EL (medio no selectivo), 0,1 mL de las correspondientes diluciones decimales se sembraban en masa en placas de Petri a las que se les adicionaba TSA+EL suplementado con la concentración máxima no inhibitoria de NaCl (TSA+YE+NaCl, medio selectivo) establecida para cada una de las cepas microbianas utilizadas en esta Tesis Doctoral (Tabla 3.5). Tras la siembra, los microorganismos se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas para todas las cepas de *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium y *S. aureus*, y durante 72 horas para las cepas de *L. monocytogenes*. Tiempos más prolongados de incubación no afectaban al número de microorganismos recuperados tras el tratamiento. La existencia de una población microbiana dañada subletalmente tras los tratamientos se determinó a partir de la diferencia entre los microorganismos recuperados en el medio no selectivo y selectivo (Figura 3.15).

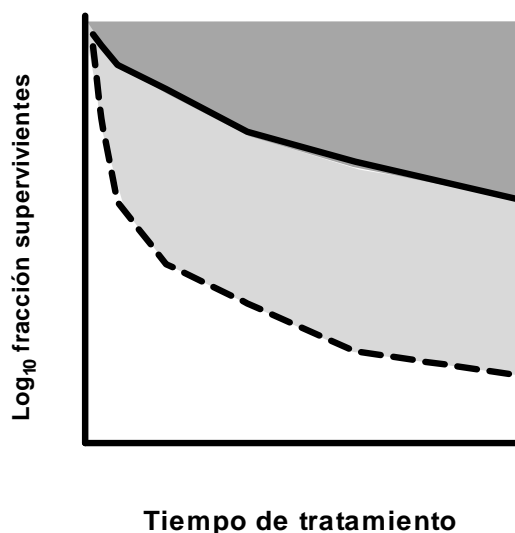


Figura 3.15. Ejemplo de gráficas de supervivencia obtenidas mediante la recuperación de los microorganismos en un medio no selectivo (línea continua) y en medio selectivo (línea discontinua). La zona oscura corresponde con la población que ha sido inactivada tras el tratamiento de PEAV y la zona clara con la población que ha sufrido daño subletal.

Tabla 3.5. Concentración máxima no inhibitoria (CMNI, %) de NaCl establecida para cada una de las cepas utilizadas en ésta Tesis Doctoral.

<i>Microorganismo</i>	<i>CMNI</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>CMNI</i>
<i>E. coli</i> 471	4%	<i>L. monocytogenes</i> 5366	3%
<i>E. coli</i> W3110	4%	<i>L. monocytogenes</i> 4031	4%
<i>E. coli</i> O157:H7	3%	<i>L. monocytogenes</i> 5672	5%
<i>E. coli</i> BJ4	4%	<i>L. monocytogenes</i> 4032	6%
<i>E. coli</i> BJ4L1	4%	<i>L. monocytogenes</i> 932	6%
<i>Salmonella</i> Typhimurium 443	3%	<i>S. aureus</i> 976	7%
<i>Salmonella</i> Typhimurium 722	5%	<i>S. aureus</i> 4465	10%
<i>Salmonella</i> Typhimurium 880	4%	<i>S. aureus</i> 4630	13%
<i>Salmonella</i> Typhimurium 878	3%	<i>S. aureus</i> 4459	11%
<i>Salmonella</i> Typhimurium 4594	3%	<i>S. aureus</i> 4466	11%

3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

3.5.1. DESARROLLO DE MODELOS MATEMÁTICOS DE INACTIVACIÓN MICROBIANA POR PEAV

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

Con objeto de estudiar la cinética de inactivación de los microorganismos seleccionados en función de las condiciones de tratamiento, las curvas de supervivencia obtenidas fueron descritas matemáticamente mediante un modelo basado en la distribución de Weibull (Mafart *et al.* (2002). Este modelo asume la existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana (*modelo primario*). En este caso, se considera que la resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull (Weibull, 1951). Las gráficas de supervivencia ajustadas con dicho modelo se describen mediante la siguiente ecuación matemática:

(Ec. 3.1)

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

donde $S(t)$ es la fracción de supervivientes obtenida tras la aplicación de un tiempo de tratamiento t expresado en μs ; δ y ρ son los parámetros del modelo. El parámetro δ , llamado parámetro de escala, es el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico decimal de la población microbiana. Por su parte, el parámetro ρ , o parámetro de forma, hace referencia al perfil que presenta la gráfica de supervivencia. Si ρ es igual a 1, la gráfica de supervivencia es lineal; si es mayor a 1, es convexa; y si es menor a 1, se considera cóncava. Los valores δ y ρ de determinaron utilizando el ajuste por mínimos cuadrados mediante la función Solver del programa Excel XP (Microsoft Corporation, Seattle, Washington DF, EE.UU.) o

con el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.).

Con objeto de estudiar la relación existente entre los parámetros del modelo y la intensidad del campo eléctrico para cada microorganismo y medio de tratamiento estudiado (*modelos secundarios*), se utilizaron modelos polinomiales de superficie respuesta mediante regresión múltiple utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, EE.UU.). Se aplicó el procedimiento de regresión paso a paso hacia atrás, que eliminó del modelo aquellos parámetros que no eran estadísticamente significativos ($P > 0,05$) mediante un análisis de varianza (Ng y Schaffner, 1997).

Finalmente, incluyendo los modelos secundarios en los modelos primarios, se obtuvieron los correspondientes *modelos terciarios* o *finales* para cada microorganismo y medio de tratamiento estudiados.

Para determinar la calidad de los ajustes, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz del error cuadrático medio (*RECM*), así como el factor de sesgo (B_f) y de exactitud (A_f) (Baranyi *et al.*, 1999):

$$(Ec. 3.2) \quad R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \hat{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}$$

$$(Ec. 3.3) \quad RECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y_i)^2}{n-1}}$$

$$(Ec. 3.4) \quad B_f = e^{\frac{\sum_{i=1}^n \ln\left(\frac{\tilde{y}_i}{y_i}\right)}{n}}$$

$$(Ec. 3.5) \quad A_f = e^{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \ln\left(\frac{\tilde{y}_i}{y_i}\right)^2}{n}}}$$

donde \tilde{y}_i es el valor estimado por el modelo; \hat{y} es la media de los valores observados; y_i es el valor observado; n es el número total de observaciones.

Mientras que el R^2 (Ec. 3.2) informa sobre la proporción de la variabilidad total que explica el modelo elegido, el *RECM* (Ec. 3.3) puede considerarse como el promedio de la discrepancia entre los valores observados y los estimados por el modelo. Un valor de 0 para el *RECM* indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores observados y los estimados con el modelo.

El factor de sesgo (B_f) (Ec. 3.4) indica el grado en el que el modelo sobreestima ($B_f > 1$) o subestima ($B_f < 1$) los datos observados. Un valor de B_f igual a 1 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores estimados y los obtenidos experimentalmente.

El factor de precisión (A_f) (Ec. 3.5) indica la exactitud media de los valores estimados. Un valor A_f igual a 1 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los obtenidos experimentalmente. Cuanto más alejado de 1 se encuentre el valor A_f , en mayor medida diferirán las predicciones de los datos observados.

3.5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con objeto de investigar los efectos y las interacciones de la temperatura y pH del medio de tratamiento, así como la concentración de nisina en la inactivación microbiana por un tratamiento PEAV de 30 kV/cm y 99 μ s, se aplicó un diseño experimental de composición central con tres factores (Figura 3.16). Las variables independientes fueron la temperatura, que variaba de 4 a 50°C, el pH investigado, en un rango de 3,5 a 7,0, y la concentración de nisina, entre 0 y 200 μ g/mL. Se obtuvieron varias réplicas del punto central para estimar la varianza debida al procedimiento experimental y al azar. El resto de experimentos se repitieron dos veces para cada combinación, y se llevaron a cabo en un orden aleatorio para evitar cualquier posible efecto debido a las condiciones experimentales utilizadas.

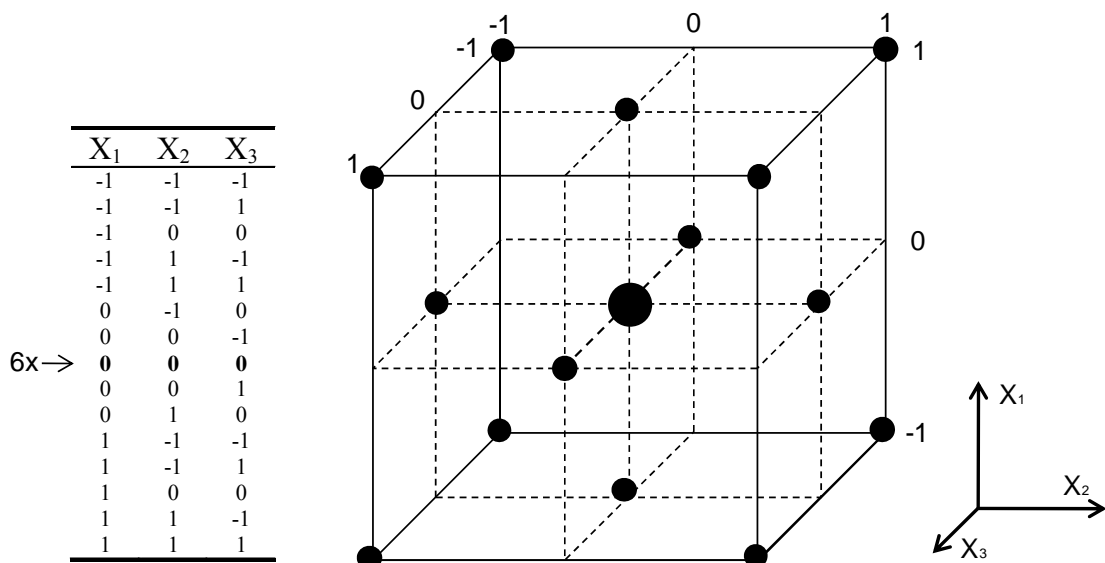


Figura 3.16. Representación general de la combinación de factores estudiados en el diseño experimental de composición central. X_1 , X_2 y X_3 son las variables consideradas en el diseño. El 0 corresponde con el valor medio y -1 y 1 con los valores extremos para el rango de estudio de X_n .

Para determinar la influencia de cada uno de los factores (temperatura, pH y concentración de nisina) en la inactivación microbiana por PEAV, los resultados obtenidos fueron analizados mediante regresión múltiple aplicando el método de superficie de respuesta. Los resultados se ajustaron a un modelo cuadrático que consideraba la influencia de cada factor individualmente, temperatura (X_1), pH (X_2) y concentración de nisina (X_3), sus interacciones ($X_1 \cdot X_2$, $X_1 \cdot X_3$, y $X_2 \cdot X_3$) y su efecto cuadrático (X_1^2 , X_2^2 y X_3^2) en la respuesta a modelizar:

$$(Ec. 3.6) \quad Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1 \times 2} (X_1 \times X_2) + \beta_{1 \times 3} (X_1 \times X_3) + \beta_{2 \times 3} (X_2 \times X_3) + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2$$

donde Y es la variable respuesta (ciclos logarítmicos de inactivación microbiana) y β_n es el coeficiente correspondiente a cada variable.

Se aplicó el procedimiento de regresión paso a paso hacia atrás, eliminando del modelo aquellos parámetros que no eran estadísticamente significativos ($P > 0,05$) mediante un análisis de varianza.

3.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

4. RESULTADOS



MANUSCRITOS:

- I. Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, I. and 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, 160-165.
- II. Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. and Raso, J. (2010). **Modelling 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, 290-298.
- III. Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. and Raso, J. (2010). **Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of different pH.** *Food Microbiology*, 27, 550-558.
- IV. Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., and Raso, J. (2010). **Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions.** *Journal of Food Engineering*, 100, 349-356.
- V. Saldaña, G., Minor-Pérez, H., Raso, J. and Álvarez, I. (2011). **Combined effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields.** *Foodborne pathogens and diseases*. DOI: 10.1089/fpd.2010.0788.
- VI. Saldaña, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J. and Álvarez, I. (2011). **Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields.** *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.059.
- VII. Saldaña, G., Álvarez, I., Condón, S. and Raso, J. (2011). **Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization.** *Trends in Food Science and Technology*. Enviado.
- VIII. Saldaña, G., Puértolas, E., Monfort, S., Raso, J., and Álvarez, I., (2011). **Defining Treatment Conditions for PEF Pasteurization of Apple Juice.** *International Journal of Food Microbiology*. Enviado.

Manuscrito I



Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ifset

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

G. Saldaña, E. Puértolas, N. López, D. García, I. Álvarez, J. Raso *

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50.013 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2008
Accepted 13 November 2008

Keywords:

Pulsed electric fields
Pasteurisation
Sublethal injury
Inactivation

ABSTRACT

The effect of pulsed electric fields (PEF) on the reduction of the population and on the occurrence of sublethal injury in five strains of two Gram-positive (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium) microorganisms was investigated in media of pH 4.0 and 7.0. Samples were subjected to 50 exponential waveform pulses of 15, 20, 25 and 30 kV/cm at a repetition rate of 1 Hz. PEF resistance and occurrence of sublethal injury depended on the electric field strength and pH of the treatment medium and varied widely among the 20 strains investigated. In general, the increment of the electric field strength from 20 to 30 kV/cm had a significant effect on the viability loss of all the strains. However this increment hardly affected the viability of *E. coli* W3110 and O157:H7 in the medium of pH 4.0 and of *L. monocytogenes* 4031, 5672 and 4032 in the medium of pH 7.0. At 30 kV/cm a population reduction higher than 4-Log₁₀ cycles was observed in two strains of *S. Typhimurium* (878, 4594) and in three strains of *S. aureus* (976, 4465, 4466) in the medium of pH 4.0. In the medium of pH 7.0, this level of reduction was observed in two strains of *E. coli* (471, BJ4L1), in three strains of *S. Typhimurium* (443, 880, 722) and in three strains of *S. aureus* (976, 4465, 4466).

In general, important sublethal injury was not observed for the strains of the two-Gram positive microorganisms in the media of pH 4.0 and 7.0 and for the strains of *S. Typhimurium* treated in the media of pH 7.0. For *E. coli* sublethal injury was detected for all the strains investigated, except the strain BJ4L1 treated at 30 kV/cm in the medium of pH 7.0.

Industrial relevance. The identification of the most PEF resistant microorganisms of public health concern is necessary to establish the treatment conditions for PEF pasteurization. Data obtained in this investigation demonstrates that the PEF resistance and the occurrence of sublethal injury may vary greatly among different strains of a bacteria and both depend on the pH of the treatment medium. Therefore the most resistant microorganisms of public health significance can be expected to vary for different foods depending of their pH.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Traditional thermal processing ensures safety and extends the shelf life of foods but can lead to detrimental changes in the organoleptic and nutritional properties of the products. The application of non-thermal processes for food preservation is a technological response to the undesirable changes induced by thermal processing in food (Arnoldi, 2002; Devlieghere, Vermeiren, & Debevere, 2004). One of these technologies gaining interest for the food industry is pulsed electric fields (PEF). It has been widely demonstrated that the application of pulses of high voltage and short duration (μ s) induces the disruption of microbial cell membranes and causes the inactivation of microorganisms (Raso & Heinz, 2006). PEF is an effective treatment for inactivating vegetative cells of bacteria and yeast (Wouters, Álvarez, & Raso, 2001; Álvarez, Condón, & Raso, 2006). As bacterial spores are

resistant to PEF treatments, the main applications of this technology for food preservation must be focussed on pasteurization (Pagán, Esplugas, Góngora-Nieto, Barbosa-Cánovas, & Swanson, 1998; Pol, Mastwijk, Slump, Popa, & Smid, 2001). The objective of pasteurization is to minimize any possible health hazards arising from pathogenic microorganisms to a level that is not likely to represent a public health risk under normal conditions of distribution and storage.

In order to establish the treatment conditions for PEF food pasteurization, it is necessary to identify the most PEF resistant microorganisms of public health concern in the food.

The identification of the microorganisms of concern depends mainly on the microbial intrinsic PEF resistance and on the influence of the food matrix on the microbial PEF resistance. It is well known that species of food-borne pathogens contain strains that can differ in their tolerance to an applied inactivation technology (Rodríguez-Calleja, Cebrián, Condón, & Mañas, 2006). It has been demonstrated that different strains or serovars of pathogens vary in their thermal, pressure or irradiation tolerance (Benito, Ventoura, Casadei, Robinson,

* Corresponding author. +Tel.: 34 976 76 26 75; fax: +34 976 76 15 90.
E-mail address: jraso@unizar.es (J. Raso).

& Mackey, 1999; Stringer, George, & Peck, 2000; Linton, McClements, & Patterson, 2001; Sherry, Patterson, & Madden, 2004; Whitney, Williams, Eifert, Marcy, 2007). However limited information is available on variation in resistance to PEF among strains of the same microorganisms and the PEF resistance of strains of different microorganisms has not been compared (Lado & Yousef, 2003; Somolinos, García, Mañas, Condón, & Pagán, 2008).

Published research on the influence of the characteristics of the food matrix on the microbial resistance to PEF indicates that it considerably varies within the pH range of the treatment medium (García, Gómez, Raso, & Pagán, 2005). Since microbial resistance to PEF may largely vary according to the pH of the treatment medium, studies to identify the strains of public health concern for PEF pasteurization should consider the influence of this factor. However the influence of the pH has not been investigated in published studies that compare the tolerance of different strains of a microorganism to PEF treatments (Lado & Yousef, 2003; Somolinos et al., 2008).

Microbial cells surviving PEF treatments also became sublethally injured and develop sensitivity to physical or chemical environments to which normal cells were resistant (García, Hassani, Mañas, Condón, & Pagán, 2005). The pH of the treatment medium influences microbial PEF resistance but also it has been demonstrated that occurrence of sublethal injury after PEF treatment depends on the pH of the treatment medium (García, Gómez, Mañas, et al., 2005). The existence of sublethal injury after the application of a given stress is important from two point views (Mackey, 2000). As the injured cell may return to its initial native state by repairing the cellular damage under suitable conditions, the existence of sublethally injured microorganisms may overestimate the effectiveness of the treatment and, as consequence, the margin of safety achieved. On the other hand, sublethal injured cells are more sensitive to stress conditions after the treatment and the success of a combined preservation system is correlated with the degree of sublethal injury caused.

In this study, the PEF resistance and the occurrence of sublethal injury after PEF treatments in five strains of two Gram-positive (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium) bacteria in media of different pH have been investigated. The goal of this investigation is to identify target strains of interest to establish treatment conditions for PEF pasteurization of foods.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The strain of *E. coli* (STCC 471), the strains of *L. monocytogenes* (STCC 5366, STCC 4031, STCC 5672, STCC 4032, STCC 932), *S. aureus* (STCC 976, STCC 4465, STCC 4630, STCC 4459, STCC 4466) and *S. Typhimurium* (STCC 443, STCC 722, STCC 880, STCC 878, STCC 4594) were supplied by the Spanish Type Culture Collection. The other strains of *E. coli*: W3110 (ATCC 27325), O157:H7, BJ4 and BJ4L1 (Krogfelt, Hjulgaard, Sorensen, Cohen, & Givskow, 2000) were kindly provided by Dr Mackey.

2.2. Culture preparation

Cultures were prepared by inoculating 5 mL tryptic soy broth (Biolife, Milan Italy) plus 0.6% (w/v) of yeast extract (TSBYE) (Biolife) with a single colony and incubated for 18 h at 37 °C. With this subculture, flask containing 50 mL of prewarmed TSBYE were inoculated to a final concentration of approximately 10³ CFU/mL and incubated at 37 °C. Over the incubation time the number of microorganisms along incubation time were enumerated by removing 1-mL aliquots from the broth and serially diluting using peptone water (0.1% w/v) and pour plating 100 µL onto tryptic soy agar (Biolife, Milan Italy) plus 0.6% yeast extract (w/v) (Biolife) (TSAYE). Plates were incubated at 37 °C for 48 h before counting. Growth curves of all the strains were completed to determine the time required for each

culture to reach stationary phase. No important differences were found between the growth curves of the strains of each microorganism. The times to reach the stationary phase of growth were 12 h for the strains of *E. coli* and *S. aureus*, 15 h for the strains of *S. Typhimurium* and 24 h for the strains of *L. monocytogenes*. All experiments were conducted with cells at the stationary phase of growth because it has been reported that cells in this phase of growth are more resistant to PEF (Cebrián, Sagarzazu, Pagán, Condón, & Mañas, 2007).

2.3. PEF equipment

High electric field pulses were generated by discharging a set of 10 capacitors of 6800 pF (Behlke, C-20C682, Kronberg, Germany) via a thyristor switch (Behlke, HTS 160- 500SCR) (Heinz, Toepfl, Knorr, 2003). A high voltage dc power supply (FUG, HCK 2500 M 35000, Rosenhein, Germany) was used for charging the set of capacitors. A function generator (Tektronix, AFG 320, Wilsonville, OR, USA) delivered the on-time signal to the switch. A cylindrical plastic tube closed with two polished stainless steel electrodes was used as batch treatment chamber. The distance between electrodes was 0.25 cm, and the electrode area was 2.01 cm².

The circuit configuration generated exponential waveform pulses at different frequencies (1–60 Hz), pulse widths and electric field strengths (1–40 kV/cm) (García, Gómez, Raso, et al., 2005). The actual electric field strength and electrical intensity applied were measured in the treatment chamber by means of a high voltage probe (Tektronix, P6015A, Wilsonville, Oregon, EE.UU) and a current probe (Stangenes Industries Inc. Palo Alto, California, EE.UU), connected to an oscilloscope (Tektronix, TDS 3012B). In all experiments, the temperature was kept under 35 °C. The temperature of the treatment medium was measured as previously described (Raso, Álvarez, Condón, & Sala, 2000).

2.4. PEF treatments

Before treatment, bacterial cultures were centrifuged at 6000 ×g for 5 min at 4 °C and re-suspended in citrate-phosphate Mcllvaine buffer of pH 4.0 or 7.0 and electrical conductivity of 2 ± 0.1 mS/cm. Next, 0.5 mL of the microbial suspensions, at a concentration of approximately 10⁹ CFU/mL, were placed in the batch treatment chamber by means of a sterile syringe, as it has been previously described (Raso et al., 2000). Samples were subjected to 50 exponential waveform pulses of 20 kV/cm (1.7 kJ/Kg), 25 kV/cm (2.7 kJ/Kg) and 30 kV/cm (3.6 kJ/Kg) at a repetition rate of 1 Hz.

2.5. Enumeration of viable and injured cells

PEF treated and control cell suspensions were serially diluted in 0.1% sterile peptone solution. The non-selective agar medium used for enumeration of viable cells of all the strains was TSAYE. TSAYE was supplemented with NaCl (TSAYE + NaCl) to determine the optimal salt level to enumerate injured cells (García, Gómez, Condón, Raso, & Pagán, 2003). Concentrations used to detect sublethal injury correspond to the highest NaCl concentrations that did not affect the growth of untreated cells. Accordingly, the media used for enumerating injured cells were TSAYE supplemented with: 3% NaCl for *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 5366, *S. Typhimurium* 878, 443, 4594 and 722; 4% for *E. coli* 471, BJ4 and BJ4L1, *L. monocytogenes* 15313, *S. Typhimurium* 880; 5% for *E. coli* 416, *L. monocytogenes* 5672 and 932; 6% *L. monocytogenes* 4032; 7% for *S. aureus* 976; 10% for *S. aureus* 4465; 11% for *S. aureus* 4459 and 4466; 13% for *S. aureus* 4630.

From the selected dilutions, 0.1 mL was pour plated into non-selective and selective agar media plates corresponding for each strain. Plates were incubated at 37 °C for 48 h to detect viable cells and for 72 to 96 h to detect injured cells. Colonies were counted with an

improved image analyser automatic counter (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK) as previously described (Condón, Palop, Raso, & Sala, 1996). The difference between the viable (CFU in TSAYE) and non-injured cells (CFU in TSAYE + NaCl) corresponds to the injured survivors. Each experiment, was performed twice on separate days and the average results are presented.

3. Results and discussion

The inactivation data for the Gram-negative and Gram-positive strains of the microorganisms investigated in the media of pH 4.0 and 7 are given in the Table 1. For each pH the first column corresponds to the viability loss when microorganisms were recovered in a non-selective medium and the second column when they were recovered in a selective medium. Despite that many studies have been conducted on microbial inactivation by PEF the broad experimental conditions, the diversity of apparatus and the different strains used in different laboratories limit the conclusion on the most resistant microorganisms to PEF (Wouters et al., 2001, Álvarez et al., 2006). In this investigation, results showed in Table 1 are directly comparable because they have been obtained in the same laboratory under the same experimental conditions.

PEF resistances of the strains investigated depended on the electric field strength and pH of the treatment medium and varied widely among the 20 strains tested. In general, increasing the electric field strength from 20 to 30 kV/cm had a significant effect on the viability loss of all the strains treated in both treatment media ($p < 0.05$). However in the medium of pH 4.0 this increment on the electric field strength hardly affected the viability of *E. coli* W3110 and O157:H7 strains. A similar pattern was observed for the *L. monocytogenes* 4031, 5672, 4032 strains in the medium of pH 7.0. Even at the highest electric field investigated (30 kV/cm), the inactivation observed in these strains of *E. coli* and *L. monocytogenes* was less than 1-Log₁₀ cycle.

At 30 kV/cm a reduction in population higher than 4-Log₁₀ cycles was observed in two strains of *S. Typhimurium* (878, 4594) and three strains of *S. aureus* (976, 4465, 4466) in the medium of pH 4.0. In the medium of pH 7.0 this level of reduction was observed in two strains of *E. coli* (471, BJ4L1) in three strains of *Salmonella* (443, 880, 722) and in three strains of *S. aureus* (976, 4465, 4466).

In general, the influence of the pH on the PEF resistance of the strains investigated did not depend on the intensity of the electric field strength applied but depended on the bacterial specie. The strains of *E. coli* were more PEF resistant at pH 4.0 than at pH 7.0. For example at 30 kV/cm the reduction in population of the *E. coli* strains W3110 and O157:H7 was less than 0.6-Log₁₀ cycles in the medium of pH 4.0 and 2.3 and 1.6-Log₁₀ cycles respectively in the medium of pH 7.0. *S. Typhimurium* strains also were more PEF sensitive at neutral pH but the influence of the pH was not as remarkable as for *E. coli* strains. The five strains of *L. monocytogenes* were more PEF resistant in the media of pH 7.0 than in the media of pH 4.0. The resistance of the five strains of *S. aureus*, except for the strain 4630 treated at 20 and 25 kV, was very similar in both media at all the electric fields investigated.

These results are consistent with published studies on the influence of pH on microbial inactivation by PEF. It has been reported that a variation of the pH of the treatment medium can increase, reduce or not modify the microbial sensitivity to PEF (Heinz & Knorr, 2000; Álvarez, Raso, Sala, & Condón, 2002; Álvarez, Raso, Sala, & Condón, 2003; Aronsson & Ronner, 2001; García, Gómez, Raso, et al., 2005). For example, García et al. (2005) comparing the PEF resistance of four species of Gram-positive bacteria and four species of Gram-negative bacteria reported that *Bacillus subtilis* var. niger, *Lactobacillus plantarum* and *L. monocytogenes* showed higher resistance at pH 7.0 than at pH 4.0 but *S. aureus* showed a similar PEF resistance at both pH. On the other hand, the four Gram-negative bacteria investigated (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Senftenberg and *Yersinia enterocolitica*) were more PEF resistant at pH 4.0 than at pH 7.0.

In this study we have observed that the influence of the pH on PEF sensitivity depended on the specie of bacteria investigated and that this influence is similar between different strains of the same specie.

Results obtained by plating the microorganisms in a non selective media correspond with the procedure used in this investigation to recover the greatest number of cells. This resuscitation of the microorganisms after the PEF treatment in presence of an appropriate substrate and recovery environmental conditions results in cells with their original capabilities and resistances and does not overestimate the effectiveness of the treatment. In this study, it has also been investigated if the PEF treatment caused sublethal injury on the strains investigated depending on the treatment intensity and pH of the treatment medium by resuscitating the microorganisms after PEF

Table 1
Viability loss and occurrence of sublethal injury of the twenty strains investigated after PEF treatments of different intensities

	20 kV/cm (85 kJ/Kg)				25 kV/cm (135 kJ/Kg)				30 kV/cm (180 kJ/Kg)			
	pH 4		pH 7		pH 4		pH 7		pH 4		pH 7	
	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S
<i>E. coli</i> 471	0.2±0.1	1.3±0.1	2.0±0.3	3.5±0.5	0.3±0.2	3.0±0.2	3.3±0.1	3.8±0.4	1.2±0.2	4.1±0.1	4.6±0.1	5.2±0.4
<i>E. coli</i> W3110	0.1±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1	2.4±0.1	0.2±0.1	1.1±0.1	0.8±0.1	3.8±0.4	0.1±0.1	2.6±0.5	2.3±0.3	4.1±0.1
<i>E. coli</i> 157:H7	0.2±0.1	0.5±0.1	1.1±0.1	2.3±0.1	0.3±0.1	0.8±0.3	1.3±0.1	3.1±0.3	0.5±0.1	1.5±0.2	1.7±0.1	4.2±0.1
<i>E. coli</i> BJ4	0.7±0.2	1.2±0.2	1.8±0.1	2.5±0.1	1.2±0.2	2.8±0.1	2.7±0.2	3.2±0.6	1.5±0.1	4.5±0.4	3.6±0.3	4.5±0.2
<i>E. coli</i> BJ4L1	0.9±0.1	2.7±0.1	2.8±0.2	3.3±0.1	1.4±0.1	3.7±0.2	2.9±0.2	3.3±0.1	2.9±0.2	4.5±0.2	4.7±0.5	4.7±0.2
<i>Salmonella</i> 443	1.5±0.1	3.2±0.2	2.9±0.3	3.1±0.2	2.3±0.2	3.1±0.5	3.4±0.2	3.4±0.2	3.2±0.2	4.0±0.1	4.2±0.2	4.3±0.2
<i>Salmonella</i> 880	0.5±0.3	1.6±0.1	2.5±0.1	2.6±0.2	2.6±0.3	2.7±0.2	3.0±0.1	3.1±0.5	3.8±0.1	3.9±0.1	4.1±0.1	4.3±0.1
<i>Salmonella</i> 722	1.7±0.2	2.8±0.2	2.9±0.5	3.4±0.1	2.1±0.1	3.6±0.2	4.3±0.2	4.4±0.2	3.0±0.1	3.9±0.2	4.4±0.2	4.4±0.2
<i>Salmonella</i> 878	2.5±0.4	3.7±0.4	1.3±0.2	1.6±0.3	3.2±0.1	4.2±0.1	2.9±0.4	2.9±0.3	4.2±0.2	4.1±0.2	3.6±0.1	3.9±0.4
<i>Salmonella</i> 4594	1.3±0.2	1.8±0.2	3.4±0.3	3.6±0.2	2.4±0.2	2.9±0.3	3.1±0.2	3.3±0.2	4.1±0.1	4.4±0.1	3.5±0.3	4.0±0.2
<i>L. monocytogenes</i> 5366	1.4±0.2	1.5±0.2	0.2±0.1	0.3±0.2	2.3±0.2	2.6±0.5	0.5±0.2	0.5±0.4	3.4±0.2	3.6±0.5	1.1±0.2	1.2±0.2
<i>L. monocytogenes</i> 4031	0.9±0.2	1.7±0.3	0.2±0.1	0.3±0.1	1.2±0.2	2.8±0.3	0.3±0.1	0.3±0.3	3.2±0.1	3.8±0.2	0.4±0.1	0.5±0.1
<i>L. monocytogenes</i> 5672	0.3±0.3	0.4±0.3	0.2±0.3	0.2±0.1	0.6±0.3	0.8±0.2	0.5±0.3	0.4±0.2	1.5±0.3	1.9±0.3	0.6±0.3	0.9±0.3
<i>L. monocytogenes</i> 4032	1.0±0.1	1.2±0.1	0.2±0.2	0.3±0.2	1.9±0.2	2.4±0.2	0.4±0.2	0.3±0.2	3.6±0.2	3.6±0.4	0.8±0.2	1.2±0.2
<i>L. monocytogenes</i> 932	1.5±0.4	1.7±0.4	0.3±0.2	0.3±0.2	2.0±0.4	2.5±0.6	0.6±0.2	1.0±0.4	3.3±0.1	3.8±0.2	1.3±0.1	1.8±0.3
<i>S. aureus</i> 976	2.6±0.1	2.7±0.2	2.7±0.2	2.5±0.2	3.3±0.1	3.1±0.2	3.5±0.5	2.9±0.2	4.3±0.6	4.5±0.2	4.5±0.1	4.3±0.2
<i>S. aureus</i> 4465	1.7±0.2	2.0±0.3	2.1±0.1	2.3±0.2	3.0±0.3	2.8±0.5	2.9±0.1	2.9±0.1	4.8±0.6	4.6±0.2	4.4±0.5	4.5±0.5
<i>S. aureus</i> 4630	1.4±0.3	1.4±0.1	0.1±0.2	0.9±0.3	2.5±0.2	2.5±0.2	1.0±0.2	2.6±0.3	3.4±0.2	3.4±0.3	2.7±0.2	3.4±0.2
<i>S. aureus</i> 4459	0.8±0.2	0.8±0.4	0.6±0.3	0.8±0.1	2.6±0.2	2.6±0.3	2.0±0.3	2.1±0.2	3.8±0.3	3.8±0.4	2.7±0.1	3.8±0.3
<i>S. aureus</i> 4466	3.0±0.1	2.7±0.2	3.1±0.2	3.2±0.1	3.8±0.2	4.3±0.2	4.0±0.2	3.8±0.1	4.5±0.2	4.2±0.2	4.1±0.2	4.3±0.2

NS: Log₁₀ cycles of inactivation in microorganisms recovered in a non-selective medium (TSAYE).

S: Log₁₀ cycles of inactivation in microorganisms recovered in a selective medium (TSAYE+ NaCl).

Number of pulses: 50. Energy per pulse: 20 kV/cm (1.7 kJ/Kg), 25 kV/cm (2.7 kJ/Kg) and 30 kV/cm (3.6 kJ/Kg).

treatment in a selective medium. The difference between the Log_{10} cycles of inactivation calculated in the non-selective and selective media was used to detect the occurrence of sublethal injury after PEF treatments.

For *E. coli*, sublethal injury was detected for all the strains treated at the three electric field strengths in both treatment media, except for the BJ4L1 strain treated at 30 kV/cm in the medium of pH 7.0. The reduction in the population when the *E. coli* cells were recovered in the selective medium was up to 3- Log_{10} cycles higher than when they were recovered in the non-selective medium. Insignificant sublethal injury was observed for the *S. Typhimurium* strains treated by PEF in the media of pH 7.0. In the medium of pH 4.0 sublethal injury was observed when the *Salmonella* cells were treated at 20, 25 and 30 kV/cm except for the strain 880. Under these treatment conditions, the inactivation in the selective medium was between 0.5 and 1.5- Log_{10} cycles higher than in the non-selective one. At 30 kV/cm, in the medium of pH 4.0 the sublethal injury tended to disappear and only a slightly higher inactivation of less than 1- Log_{10} cycle was observed in the selective media for the strains 443, 722. In general, for the strains of the two Gram-positive microorganisms investigated, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, sublethal injury was not observed for the most of the strains investigated. In the medium of pH 4.0 sublethal injury was only detected for the *L. monocytogenes* 4031 strain treated at 20 and 25 kV/cm and in the medium of pH 7.0 it was only detected sublethal injury for the *S. aureus* 4630 strain at the three electric fields investigated.

In order to show the variability between the PEF resistance of the five strains of each microorganism and to identify the most resistant and most sensitive strains data corresponding to microbial inactivation at 30 kV/cm in media of pH 4.0 and 7.0 were plotted in a column scatter graph (Fig. 1). Each point of the graph corresponds to the Log_{10} cycles of inactivation reached for each strain. The horizontal lines correspond to the mean value of the Log_{10} cycles of inactivation of the 5 strains of each microorganism.

PEF resistance varied widely among the strains of *E. coli* tested in both treatment media being the resistance of each strain higher at low pH. In the medium of pH 4.0 the number of cells of the most sensitive strain was reduced by around 3- Log_{10} cycles, while population of the most resistant strain was not affected by the treatment at 30 kV/cm. In the medium of pH 7.0, the population of the

most resistant strain was reduced by 1.7- Log_{10} cycles and of the most sensitive strain was reduced 4.7- Log_{10} cycles. Independently of the pH of the treatment medium *E. coli* W3110 and O157:H7 were the most resistant strains and *E. coli* BJ4L1 was the most sensitive one. This last strain is a *rpoS* null mutant that lacks the stationary phase sigma factor (*rpoS*) that acts activating the expression of many genes, some of which are considered responsible for the generalized increases in stress resistance upon entry into stationary phase of growth (Huissman, Siegele, Zambrano, & Kolter, 1996; Krogfelt et al., 2000). It has been proved that the lack of this factor decreased the resistance of *E. coli* to PEF and high hydrostatic pressure (Robey et al., 2001).

A PEF treatment of 30 kV/cm was very effective in reducing the populations of *S. Typhimurium* strains in both treatment media and the variability on PEF resistance among the strains of these microorganisms, was lower than among the strains of the other Gram-negative microorganism investigated, *E. coli*. The PEF treatment at 30 kV/cm inactivated between 3 and 4- Log_{10} cycles the population of the 5 strains of *S. Typhimurium* in the medium of pH 4.0. At this pH, the strains of *S. Typhimurium* were much more PEF sensitive than the strains of *E. coli*. The number of cells of the most resistant strain (722) was reduced by 3- Log_{10} cycles that corresponded with the reduction of the most sensitive strain of *E. coli*. Overall the pH of the treatment medium barely affected the PEF resistance of *S. Typhimurium*. In the medium of pH 7.0 the level of inactivation reached was between 3 and 4- Log_{10} cycles. It is interesting to note that the more resistant strains at low pH are not necessarily those most sensitive at neutral pH. The most resistant strains of *S. Typhimurium* tested at pH 4.0, 443 and 722, were the most sensitive at pH 7.0.

The PEF resistance of 4 of the 5 strains of *L. monocytogenes* was similar at pH 4.0. The treatment applied reduced the population between 3 and 3.5- Log_{10} cycles for all strains except for the strain 5672 that was much more resistant and showed an inactivation of around 1- Log_{10} cycle. The differences between the PEF resistance at 30 kV/cm of the *L. monocytogenes* strains in the medium of pH 7.0 were very low. This could be attributed to the fact that this electric field strength was not very effective against *L. monocytogenes* at pH 7.0. None of the strains showed a reduction greater than 1.5- Log_{10} cycles.

S. aureus strains varied widely in their response to PEF treatments at 30 kV/cm in both treatment media. While in the acidic medium the inactivation of the *S. aureus* strains ranged from 3.5 to 5- Log_{10} cycles,

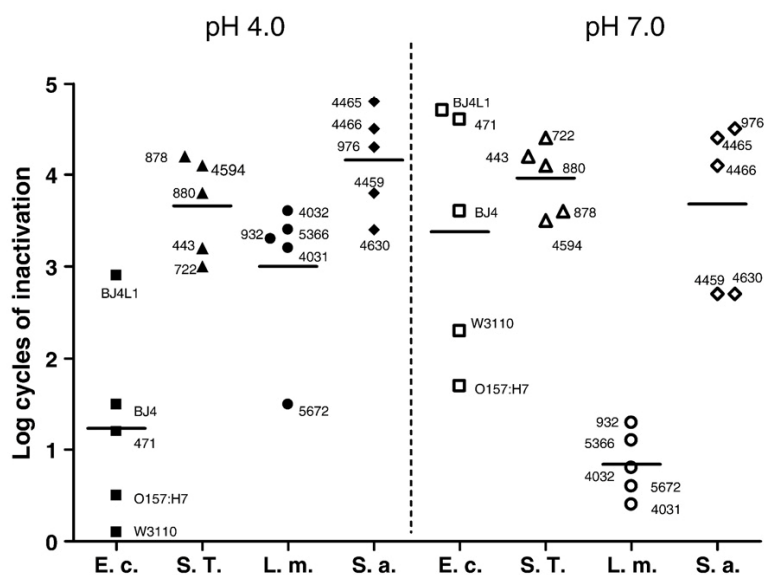


Fig. 1. Comparison of the PEF resistance (30 kV/cm, 50 pulses) of the strains investigated in media of pH 4.0 (closed symbols) and pH 7.0 (open symbols). E. c.: *Escherichia coli* (■, □); S. T.: *Salmonella Typhimurium* (▲, △); L. m.: *Listeria monocytogenes* (●, ○); S. a.: *Staphylococcus aureus* (◆, ◇).

in the neutral medium it ranged from 2.5 to 4.5-Log₁₀ cycles. For this microorganism the most resistant (4465) and most sensitive (4630) strains at pH 4.0 were the most resistant and sensitive ones at pH 7.0.

PEF treatment at 30 kV/cm had much greater effect on *S. aureus* than on *L. monocytogenes*. For example, in the medium of pH 4.0, the strain of *S. aureus* with the smaller inactivation was 4630, with around 3.5-Log₁₀ cycles, similar as the inactivation of the most sensitive strain of *L. monocytogenes*.

In order to show variability on the occurrence of sublethal injury between the five strains of each microorganism data corresponding to the difference between the non-injury cells (recovered in selective media) and viable cells (recovered in the non-selective medium) after the treatment at 30 kV/cm in media of pH 4.0 and 7.0 were plotted in a column scatter graph (Fig. 2A and B).

The proportion of sublethal injured cells of the strains of *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* after the treatment at 30 kV/cm was low being the difference between the non-injured and viable cells lesser than 1-Log₁₀ cycle. However for *E. coli*, an important proportion of sublethal injured cells was observed for the 5 strains treated in the medium of pH 4.0 and for the strains O157:H7 and W3110 treated in the medium of pH 7.0. It is remarkable to note that the strain O157:H7, that showed the highest level of injury when the cells were treated at pH 7.0 was the *E. coli* strain that showed the lowest level of injury when treated at pH 4.0. On the other hand, the level of injury observed in the strain W3110, one of the most PEF resistant strain, was higher than two Log₁₀ cycles. This occurrence of sublethal injury opens the possibility of increasing cell death of this PEF-resistant strain by combining PEF with other preservation factors (Raso & Barbosa-Cánovas, 2003).

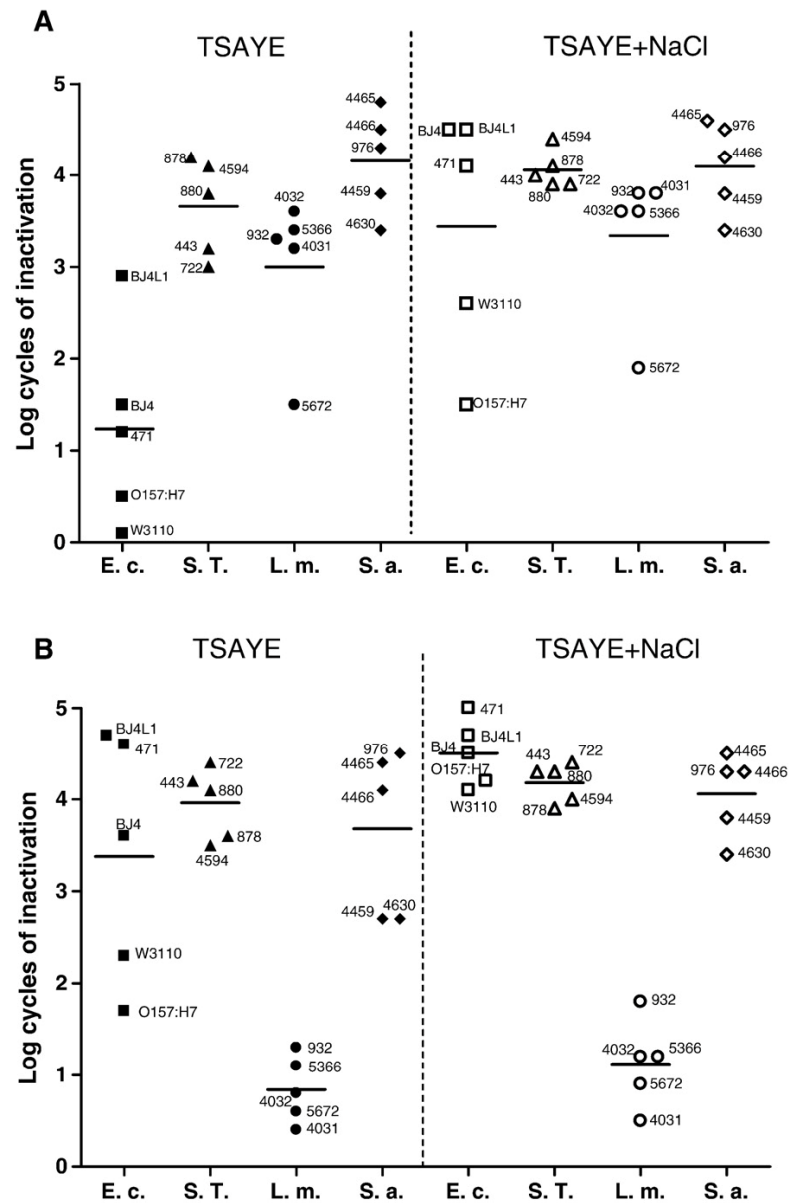


Fig. 2. Occurrence of sublethal injury after a PEF treatment (30 kV/cm, 50 pulses) of the strains investigated in media of pH 4.0 (A) and pH 7.0 (B). Microorganisms recovered in TSAYE (closed symbols); microorganisms recovered in the TSAYE + NaCl (open symbols). E. c.: *Escherichia coli* (■, □); S.T.: *Salmonella Typhimurium* (▲, △); L. m.: *Listeria monocytogenes* (●, ○); S. a.: *Staphylococcus aureus* (◆, ◇).

The mechanism of inactivation of microorganisms by PEF is not clearly understood but almost always includes perturbation of the cell membrane and loss of the cell membrane function (Heinz, Álvarez, Angersbach, & Knorr, 2001; Pagán & Mañas, 2006; García, Mañas, Gómez, Raso, & Pagán, 2006). Therefore differences in membrane composition and the ability of repairing the damaged membrane may influence the PEF resistance of different strains of a bacterial specie, the effect of the pH of the treatment medium on microbial PEF sensitivity and the occurrence of sublethal injury after the PEF treatments.

In conclusion, data obtained in this investigation demonstrate that the PEF resistance and the occurrence of sublethal injury of different strains of a given bacteria specie may vary greatly and both they depend on the electric field strength and the pH of the treatment medium. Comparing the PEF resistance of the 20 strains investigated, it is interesting to note that the most sensitive strains at low pH are not necessarily those most sensitive at neutral pH. This has practical implications for PEF processing of foods. The most resistant microorganisms of public health significance can be expected to vary for different foods depending on their pH. Further investigations of the kinetic of inactivation of the most resistant strains and on mechanisms of inactivation in the most resistant and most sensitive strains of a specie could contribute to optimize the efficacy of PEF processes by getting a better understanding on the mechanisms of bacterial resistance to PEF. According to the results obtained in this investigation the most PEF resistant microorganism in the medium of pH 4.0 corresponded to the strains of *E. coli* W3110 and O157:H7, and the most resistant ones in the medium of pH 7.0 corresponded to the strains of *L. monocytogenes* 4031 and 5672. These strains should be taken in consideration when choosing target microorganisms for modelling microbial PEF inactivation to establish safe optimized processes that are applicable under a wide range of conditions.

Acknowledgements

This study has been carried out with financial support from the Commission of the European Communities, Framework 6, Priority 5 'Food Quality and Safety', Integrated Project NovelQ FP6-CT-2006-015710.

References

- Álvarez, I., Condón, S., & Raso, J. (2006). Microbial inactivation by pulsed electric fields. In J. Raso, & V. Heinz (Eds.), *Pulsed electric fields technology for the food industry: fundamentals and applications* (pp. 97–124). New York: J. Springer.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J., & Condón, S. (2002). Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 489–493.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J., & Condón, S. (2003). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20, 691–700.
- Arnoldi, A. (2002). Thermal processing and nutritional quality. In C. J. K. Henry, & C. Chapman (Eds.), *The Nutrition Handbook for Food Processing* (pp. 265–286). Cambridge (England): Woodhead.
- 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 Emerging Technologies*, 2, 105–112.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T., & Mackey, B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1564–1569.
- Cebrián, G., Sagarazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2007). Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 304–311.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., & Sala, F. J. (1996). Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 149–152.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International of Dairy Journal*, 14, 273–285.
- García, D., Gómez, N., Condón, S., Raso, J., & Pagán, R. (2003). Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 140–144.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., & Pagán, R. (2005). Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 94–104.
- García, D., Gómez, N., Raso, J., & Pagán, R. (2005). Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 388–395.
- García, D., Hassani, M., Mañas, P., Condón, S., & Pagán, R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Safety*, 100, 428–435.
- García, D., Mañas, P., Gómez, N., Raso, J., & Pagán, R. (2006). Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 428–435.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A., & Knorr, D. (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – Basic concepts for process design. *Trends Food Science and Technology*, 12, 103–111.
- Heinz, V., & Knorr, D. (2000). Effect of pH, ethanol addition and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus subtilis* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 151–159.
- Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 165–175.
- Huissman, G. W., Siegele, D. A., Zambrano, M. M., & Kolter, R. (1996). Morphological and physiological changes during stationary phase. In F. C. Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology* (pp. 1672–1682). Washington: American Society for Microbiology.
- Krogfelt, K. A., Hjulgaard, M., Sorensen, K., Cohen, P. S., & Givskow, M. (2000). rpoS gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* B4 during competitive colonization of the mouse large intestine. *Infection and Immunity*, 68, 2518–2524.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2003). Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field processing optimization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2223–2229.
- Linton, M., McClements, J. M. J., & Patterson, M. F. (2001). Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 99–104.
- Mackey, B. M. (2000). Injured bacteria. In M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 315–341). Gaithersburg, (Maryland): Aspen Publisher.
- 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 Science and Technology International*, 4, 33–44.
- Pagán, R., & Mañas, P. (2006). Fundamental aspects of microbial membrane electroporation. In J. Raso, & V. Heinz (Eds.), *Pulsed electric fields technology for the food industry: fundamentals and applications* (pp. 73–94). New York: Springer.
- Pol, I. E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E., & Smeid, E. J. (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 64, 1012–1018.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., & Sala, F. J. (2000). Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 21–30.
- Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 43, 265–285.
- Raso, J., & Heinz, V. (2006). *Pulsed electric fields for the food industry: fundamentals and applications*. New York: Springer.
- Robey, M., Benito, A., Hutson, R. H., Pascual, C., Park, S. F., & Mackey, B. M. (2001). Variation in resistance to high hydrostatic pressure and rpoS heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4901–4907.
- Rodríguez-Calleja, J. M., Cebrián, C., Condón, S., & Mañas, P. (2006). Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1054–1062.
- Sherry, A. E., Patterson, M. F., & Madden, R. H. (2004). Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 887–893.
- Somolinos, M., García, D., Mañas, P., Condón, S., & Pagán, R. (2008). Effect of environmental factors on the survival of *Escherichia coli* strains to pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 260–267.
- Stringer, S. C., George, S. M., & Peck, M. W. (2000). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Applied Microbiology Symposium*, 88, 795–895.
- Whitney, B. M., Williams, R. C., Eifert, J., & Marcy, J. (2007). High-pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157:H7 strains and *Salmonella* serovars in tryptic soy broth, distilled water, and fruit juice. *Journal of Food Protection*, 70, 2078–2083.
- Wouters, P., Álvarez, I., & Raso, J. (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Science and Technology*, 12, 112–121.

Manuscrito II



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

G. Saldaña, E. Puértolas, S. Condón, I. Álvarez, J. Raso*

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50.013 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2009

Accepted 8 January 2010

Keywords:

Cell damage

E. coli

Inactivation

PEF

Salmonella

ABSTRACT

A study of the effect of pulsed electric fields (PEF) on the kinetics of inactivation and the occurrence of cell damage in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878 treated in McIlvaine buffer covering a range from pH 3.5 to 7.0 was conducted. Mathematical equations based on the Weibull distribution were developed to describe the influence of the electric field strength, treatment time and pH of the treatment medium on the lethality and generation of cell damage of both Gram negative pathogenic bacteria after the application of PEF treatments. *E. coli* O157:H7 was more PEF resistant than *Salmonella* Typhimurium at all pH investigated. PEF resistance of *E. coli* was influenced by the pH but the pH hardly affected the PEF resistance of *Salmonella* Typhimurium 878. After 150 μ s at 35 kV/cm, 1 and 5 \log_{10} cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 were observed in the range of pH 3.5–4.5 and 5.5–6.5, respectively. Cell damage increased with the field strength and treatment time. A maximum cell damage level of 4.2 and 2.7 \log_{10} cycles for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium was observed respectively after a treatment of 30 kV/cm at pH 3.5. PEF induced cell damage was not detected at pH higher than 5.0 for both microorganisms. The developed equations can be applied to design combining processes which can increase the lethality of PEF or to reduce the intensity of PEF treatments to achieve a determine level of microbial inactivation.

Industrial relevance: This study demonstrates that when the influence of several factors on the microbial behavior is investigated, the development of mathematical models is a very useful tool to evaluate the influence of each parameter and their interactions. In this study, it has been mathematically described for first time the influence of the pH of the treatment medium and the occurrence of sublethal injury in a wide range of electric field strengths and treatment times in two Gram negative pathogenic bacteria, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878. These models would also be of interest for engineering design, evaluation and optimization of PEF process as a new technique for food preservation.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, several technologies that have the capability of inactivating microorganisms at lower temperatures than the conventional heat treatments have been investigated (Arnoldi et al., 2002; Devlieghere, Vermeiren, & Debevere, 2004; Lado & Yousef, 2002; Mañas & Pagán, 2005). One of these technologies is pulsed electric fields (PEF) that encompass the discharge of high voltage electric short pulses through a food (Barbosa-Cánovas, Pierson, Zhang, & Schaffner, 2001). It has been demonstrated that these treatments inactivate vegetative cells of bacteria and yeasts (Wouters, Álvarez, & Raso, 2001). As bacterial spores are resistant to PEF treatments, the main applications of this technology for food preservation must be

focused on pasteurization of liquid foods (Pagán, Esplugas, Góngora-Nieto, Barbosa-Cánovas, & Swanson, 1998; Pol, Mastwijk, Slump, Popa, & Smid, 2001).

In order to use PEF technology as a pasteurization process, it is necessary to accumulate knowledge on the critical factors affecting microbial inactivation of pathogenic bacteria, to describe their PEF inactivation kinetics and to understand the mechanisms involved on microbial PEF inactivation (Álvarez, Condón, & Raso, 2006). Electric field strength and treatment time are two of the main process parameters which substantially influence the microbial inactivation by PEF (Wouters, Álvarez, et al., 2001). It has been widely described that PEF lethality increases with the field strength and treatment time (Álvarez, Pagán, Condón, & Raso, 2003; Amiali, Ngadi, Smith, & Raghavan, 2007; Gómez, García, Álvarez, Raso, & Condón, 2005; Lebovka & Vorobiev, 2004; Pérez, Aliaga, Bernat, Enguidanos, & López, 2007; Rodrigo, Ruíz, Barbosa-Cánovas, Martínez, & Rodrigo, 2003). Another main parameter determining microbial PEF sensitivity is the pH of the treatment medium. It is generally assumed that Gram

* Corresponding author. Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50.013 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976 76 26 75; fax: +34 976 76 15 90.
E-mail address: jraso@unizar.es (J. Raso).

positive bacteria are more PEF resistant in neutral media and Gram negative in acidic conditions (García, Gómez, Mañas, Condón, Raso, & Pagán, 2005; García, Gómez, Raso, & Pagán, 2005). Recently, it has been reported a variability to PEF among strains of the same microorganism (Lado & Yousef, 2003; Rodríguez-Calleja, Cebrián, Condón, & Mañas, 2006; Somolinos, García, Mañas, Condón, & Pagán, 2008). Since bacterial resistance to PEF depends on the pH of the treatment medium, several investigations have been conducted in order to determine the variability in resistance among distinct strains in media of different pH (Saldaña et al., 2009; Somolinos et al., 2008).

Another factor of interest to estimate the effect of PEF on microorganisms is the occurrence of cell damage after PEF treatments. Microbial cells surviving PEF treatments also became sublethally injured and the occurrence of cell damage depends on the field strength, treatment time and pH of the treatment medium (García, Gómez, Condón, Raso, & Pagán, 2003; García, Gómez, Mañas, et al., 2005; García, Gómez, Mañas, Raso, & Pagán, 2007; Wouters, Bos, & Ueckert, 2001). However, there is not a systematic study of the influence on the occurrence of sublethal injury of these parameters in a wide range of conditions which permit to determine the most suitable combinations for PEF pasteurization and also to acquire a better understanding on the mechanisms of bacterial resistance to PEF.

Escherichia coli O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are well-known foodborne pathogens that frequently cause foodborne illness outbreaks (Anonymous, 2002; Plym Forshell, & Wierup, 2006; Vojdani, Beuchat, & Tauxe, 2008; Wheeler et al., 1999). Products involved in these outbreaks include foods of different pH like those of low pH, in which these microorganisms can survive for long periods (Zhao, Doyle, & Besser, 1993).

In this study it has been investigated the influence of the pH of the treatment medium and the occurrence of sublethal injury in a wide range of field strengths and treatment times in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878. A previous screening study carried out in our laboratory with five strains of different Gram negative pathogenic bacteria demonstrated that these microorganisms were the most PEF-resistant strains among the tested ones (Saldaña et al., 2009).

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

The strain of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 was supplied by the Spanish Type Culture Collection. The strain of *E. coli* O157:H7 used in this investigation is a VTEC- (Phage type 34) isolated by Dr. Chapman (Chapman et al., 1993). Broth subcultures were prepared by inoculating 5 mL tryptic soy broth (Biolife, Milan Italy) plus 0.6% (w/v) of yeast extract (Biolife) (TSBYE) with a single colony and incubated for 18 h at 37 °C. With this subculture, flasks containing 50 mL of prewarmed TSBYE were inoculated to a final concentration of approximately 10⁶ CFU/mL. The culture was incubated under agitation at 37 °C until the stationary growth phase was reached, 24 hours (Saldaña et al., 2009).

2.2. PEF equipment

PEF equipment used in this investigation was supplied by ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden). The apparatus generates square waveform pulses of a width of 3 μs with a frequency up to 300 Hz. The maximum output voltage and current were 30 kV and 200 A, respectively. The equipment consists of a direct current power supply (DCPS) which converts the 3-phase line voltage to a regulated DC voltage. It charges up 6 IGBT switching modules (high-power solid-state switches) to a primary voltage around 1000 V. An external trigger pulse gates all the modules and controls its discharge to a primary pulsed signal of around 1000 V. Finally, a

pulse transformer transforms this primary 1000 V pulse to a high voltage pulse of desired high voltage.

Microorganisms were treated in a static parallel-electrode treatment chamber with a distance between electrodes of 0.25 cm and an area of 2.01 cm². With an electrical conductivity of the sample of 0.10 S/m at 20 °C the ohmic resistance of the treatment chamber is 124 Ω. Actual electric field strength applied and pulse width were measured in the treatment chamber with a high voltage probe connected to an oscilloscope (Tektronix, TDS 220, Wilsonville, OR). Treatment time was calculated by multiplying the pulse width (τ) by the number of pulses applied. The frequency of the pulses was controlled by an external function generator (Tektronix, AFG 320, Wilsonville, OR). The temperature of the treatment medium was measured as previously described (Raso, Álvarez, Condón, & Sala, 2000).

2.3. Microbial inactivation experiments

Before treatment, microorganisms were centrifuged at 6000 ×g for 5 min. at 4 °C and re-suspended in citrate-phosphate McIlvaine buffer of different pH (3.5, 4.5, 5.5 and 7.0) (Dawson, Elliot, Elliot, & Jones, 1974) which concentration was adjusted to an electrical conductivity of 0.10 ± 0.01 S/m. The microbial suspension (0.5 mL) at a concentration of approximately 10⁸ CFU/mL was placed into the treatment chamber with a sterile syringe, as it has been previously described (Raso et al., 2000). Cumulative treatment times ranged from 15 to 501 μs and electric field strengths were set at 15, 20, 25, 30 and 35 kV/cm which corresponded to specific energies per pulse of 0.7, 1.2, 1.9, 2.7 and 3.7 kJ/kg, respectively. A pulse frequency of 1 Hz was used. Under these conditions, the final temperature of the treatment media was always below 35 °C.

2.4. Enumeration of viable and injured cells

PEF treated and control cell suspensions were serially diluted in 0.1% sterile peptone solution. The non-selective agar medium used for enumeration of viable cells of all the strains was tryptic soy agar (Biolife, Milan Italy) plus 0.6% (w/v) of yeast extract (Biolife) (TSAYE). TSAYE was supplemented with NaCl (TSAYE+NaCl) (selective agar medium) at the optimal salt level to enumerate injured cells (García et al., 2003). Concentrations used to detect sublethal injury correspond to the highest NaCl concentrations that did not affect the growth of untreated cells (maximum non-inhibitory concentration). Based on previous results, this concentration for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium was 3% (Saldaña et al., 2009).

From selected dilutions, 0.1 mL was pour plated into non-selective and selective agar media plates. Plates were incubated at 37 °C for 24 h to detect viable cells and for 48 h to detect injured cells. Longer incubation times did not increase the microbial counts. Colonies were counted with an image analyzer automatic counter (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK) as previously described (Condón, Palop, Raso, and Sala (1996). The difference between the viable (CFU in TSAYE) and non-injured cells (CFU in TSAYE+NaCl) corresponds to the injured survivors. Each experiment was performed twice on separate days and the average results are presented.

2.5. Curve fitting

A mathematical model based on the Weibull distribution was used to fit the survival curves of the different microorganisms:

$$\log_{10} \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (1)$$

where N_t is the number of microorganisms that have survived to the treatment, N_0 is the initial number of the microbial population, t is the treatment time (in μs), and δ and p are respectively the scale and

shape parameters. The δ value represents the treatment time necessary to inactivate the first \log_{10} cycle of the microbial population. The p parameter accounts for upward concavity of a survival curve ($p < 1$), a linear survival curve ($p = 1$), and downward concavity ($p > 1$) (Mafart, Couvert, Gaillard, & Leguerinel, 2002).

To determine the δ and p values, the least-squares criterion by the Solver function of the Excel 2007 package (Microsoft, Seattle, WA) and the GraphPad PRISM® (Graph Software, San Diego, CA) was used. Polynomial (response surface) models for the effects of field strength and pH of the treatment medium on the estimated δ and p values were generated by Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, USA). Estimated δ and p values corresponding to survival curves in which the maximum level of inactivation was lower than 1 \log_{10} cycle were not used to generate the response surface models. Backward stepwise regression was used to eliminate the parameters which were not significant in the model (Ng & Schaffner, 1997).

In order to determine the accuracy of the final models, the root mean square error (RMSE), the bias (B_f) and the accuracy factors (A_f) were used (Baranyi, Pin, & Ross, 1999). The bias factor indicates by how much on average, a model overpredicts (bias factor > 1) or underpredicts (bias factor < 1) the observed data. On the other hand, the accuracy factor indicates how many the estimated data differ from the observed ones.

Significantly differences among the shape parameters (p values) obtained after the fit of equation 1 to the survival curves were evaluated by ANOVA analyses ($p = 0.05$) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

3. Results

Figs. 1 and 2 show respectively the influence of the pH (Fig. 1) and the electric field strength (Fig. 2) on the PEF inactivation and occurrence of cell damage after the application of PEF treatments in *E. coli* O157:H7 (Figs. 1A and 2A) and *Salmonella* Typhimurium (Figs. 1B and 2B). Fig. 1 shows as an example the survival curves of these microorganisms in McIlvaine buffer of pH 7.0, 5.5, 4.5 and 3.5 at the medium electric field strength investigated (25 kV/cm), when recovered in a non-selective (continuous lines) and selective medium (dotted lines). The highest PEF resistance and PEF sensitivity for *E. coli* O157:H7 were observed at pH 3.5 and 5.5, respectively. In the case of *Salmonella* Typhimurium, the highest PEF sensitivity was also observed at pH 5.5 for treatment times shorter than 300 μ s. Over this treatment time, PEF resistance of *Salmonella* Typhimurium was not influenced ($p > 0.05$) by the pH. When sublethal injury was investigated, cell damage was observed in *E. coli* O157:H7 at pH 3.5, 4.5 and 7.0. In the case of *Salmonella* Typhimurium cell damage was only detected at pH 3.5 and 4.5 for treatment times shorter than 300 μ s.

Fig. 2 shows the survival curves of the microorganisms in McIlvaine buffer of pH 3.5 at the electric field strengths investigated when recovered in a non-selective and selective medium. In both microorganisms, microbial inactivation increased with the field strength from 15 to 35 kV/cm. As it can be observed, *E. coli* O157:H7 was more PEF resistant than *Salmonella* Typhimurium. At the most intensive PEF treatment (35 kV/cm; 501 μ s), while 3.2 \log_{10} cycles of inactivation was achieved for *E. coli* O157:H7, in the case of *Salmonella* Typhimurium 5.0 \log_{10} cycles were reached.

Concerning the influence of the electric field strength on the occurrence of cell damage, the number of sublethally injured cells of *E. coli* O157:H7 increased with the electric field strength up to 30 kV/cm. The survival curves corresponding to the microorganisms recovered in selective media after 30 and 35 kV/cm were similar. Since the PEF treatment at 35 kV/cm was more effective than at 30 kV/cm, the number of damaged cells at 35 kV/cm was lesser than at 30 kV/cm. For *Salmonella* Typhimurium, cell damage increased by augmenting the electric field strength and treatment time at 15 and 20 kV/cm. At higher electric field strengths cell damage was more remarkable at

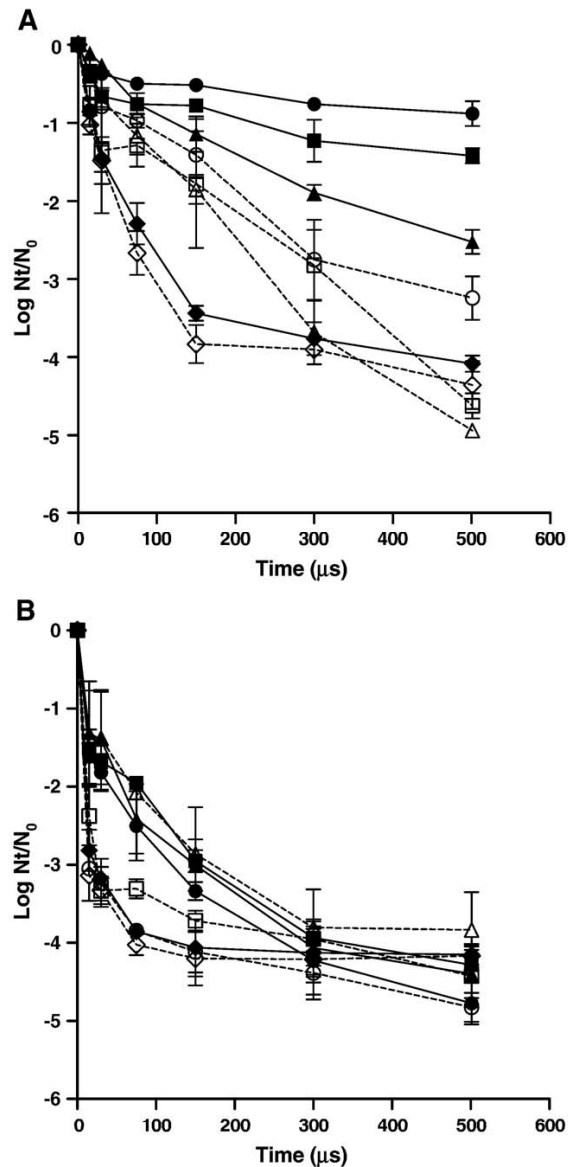


Fig. 1. Influence of the pH of the treatment medium on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Typhimurium 878 (B) treated by PEF at 25 kV/cm and recovered in non-selective (continuous line) and selective media (dotted line). Treatment conditions: McIlvaine buffer of pH 7.0 (▲), 5.5 (◆), 4.5 (■) and 3.5 (●); 0.1 S/m; 1 Hz.

treatment times lower than 50 μ s, being also 30 kV/cm the electric field strength at which the occurrence of cell damage was most significant.

Survival curves of both bacteria recovered in non-selective and selective media were concave upwards at any pH and electric field strength investigated. The microbial inactivation was faster at the first moments of the treatment, and then progressively declined. The 80 survival curves obtained in this investigation were fitted to Eq. (1) (primary model). The estimated parameters δ and p obtained are shown in Table 1. RMSE and R^2 of the fits ranged from 0.02 to 0.55 and from 0.87 to 0.99, respectively. For both microorganisms investigated, the shape parameter (p value) was always lower than 1.

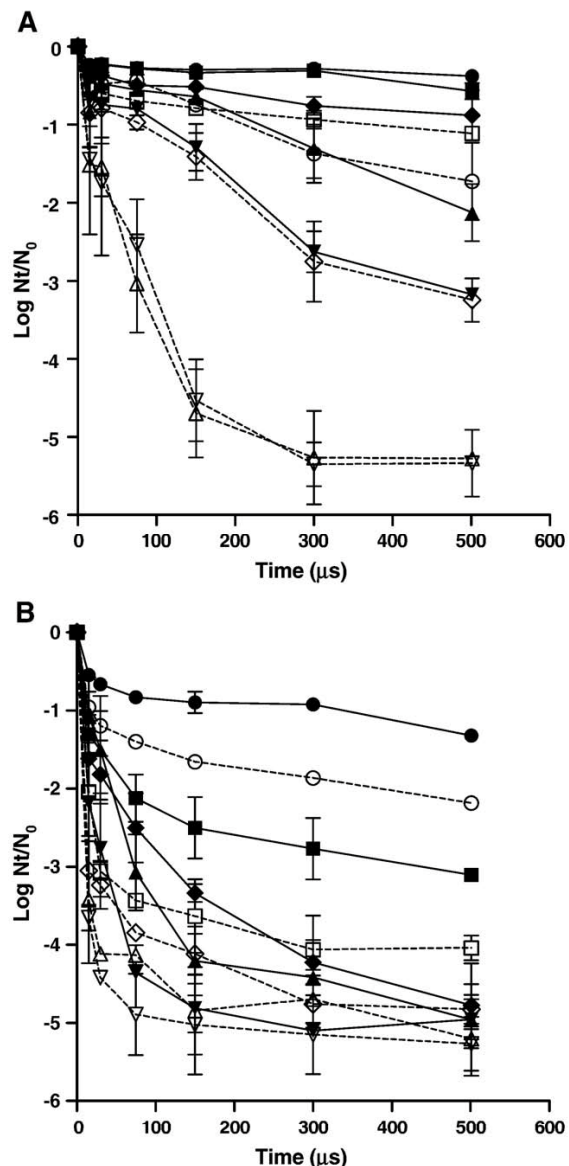


Fig. 2. Influence of the electric field strength on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Typhimurium 878 (B) treated by PEF at pH 3.5 and recovered in non-selective (continuous line) and selective media (dotted line). Treatment conditions: Electric field strengths of 15 (●), 20 (■), 25 (◆), 30 (▲) and 35 (▼) kV/cm; McIlvaine buffer of pH 3.5; 0.1 S/m; 1 Hz.

The time to reduce 1 \log_{10} cycle the population (δ value) of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium by PEF at all pH decreased when increasing the electric field strength. δ values were significantly smaller ($p < 0.05$) when microorganisms were recovered in selective media. In both microorganisms, shorter δ values were determined in pH 5.5. Non-significant differences ($p > 0.05$) were observed among the shape parameter (p value) obtained for *Salmonella* Typhimurium recovered in non-selective and selective media and for *E. coli* O157:H7 recovered in selective media at the different pH and electric field strengths investigated. Therefore, p mean values of 0.2422 and 0.1722 were considered for *Salmonella* Typhimurium when recovered in non-selective and selective media, respectively, and of 0.4267 for *E. coli* O157:H7 recovered in selective media. The relationship be-

tween the shape parameter and pH of the treatment medium in non-selective media in the case of *E. coli* O157:H7 was described by following equation (secondary model):

$$p = 1.3084 - 0.0419 pH^2 + 0.0013e^{pH} (R^2 = 0.987; RMSE = 0.079).$$

The relationships among the δ value, electric field strength and pH of the treatment medium in non-selective and selective media were described by multiple regression using polynomial equations (secondary model). Backward stepwise regression was used to eliminate insignificant variables, since these variables or their interactions did not provide any additional useful information to the model (Ng & Schaffner, 1997). Table 2 shows the coefficients of each variable used for the polynomial equation to fit the δ values. This table also includes the RMSE and the adjusted R -squared to show the goodness of the fit of the developed secondary models.

Combining the secondary and primary models (tertiary model) it is possible to estimate the microbial inactivation and the occurrence of sublethal injury in the range of the experimental conditions investigated. Plots of the observed and estimated data with the tertiary models are given in Figs. 3 and 4 for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium, respectively, in non-selective (Figs. 3A and 4A) and selective media (Figs. 3B and 4B). The difference between points of the graph and the line of equivalence is a measure of the inaccuracy of the corresponding estimation. The RMSE, R^2 , A_f and B_f factors for each prediction are indicated also in the figures.

Fig. 5 shows three-dimensional relationships among the \log_{10} of the survival fraction, the electric field strength, and the pH of the treatment medium at a determine treatment time (100 μ s) for *E. coli* O157:H7 (Fig. 5A) and *Salmonella* Typhimurium (Fig. 5B) after PEF treatments. In the case of *E. coli* O157:H7, the pH of the treatment medium had a remarkable influence on the PEF resistance observing higher PEF sensitivity in the range of pH from 5.5 to 6.5. In this range, the influence of the field strength on the *E. coli* inactivation was more significant. For *Salmonella* Typhimurium, PEF inactivation mainly depended on the field strength. Slightly higher inactivation was observed at pH ranging from 5.5 to 6.5. By comparing both graphs (Fig. 5A and B), it can be determined that *E. coli* O157:H7 was more PEF resistant than *Salmonella* Typhimurium in the pH ranged from pH 3.5 to 5.5 and from 6.5 to 7.0. At pH ranging from 5.5 to 6.5, PEF resistance of both microorganisms was similar when comparisons were done at the same electric field strength and treatment time.

The peculiar behavior concerning to the higher PEF sensitivity of *E. coli* O157:H7 in the range of pH 5.5 to 6.5 predicted by the model has not been previously described in literature. In order to confirm this prediction, a new set of experiments was carried out in this range of pH. When observed and estimated values were compared a good agreement was observed ($R^2 = 0.877$; RMSE = 0.354; $A_f = 1.121$; $B_f = 0.956$).

The developed tertiary models also permitted to estimate the level of cell damage caused by PEF of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in treatment media of different pH. Based on the models, a maximum cell damage level of 4.2 and 2.7 \log_{10} cycles for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium was observed respectively after a treatment of 30 kV/cm at pH 3.5. As an example of the utility of the models, Fig. 6A and B represent the iso- \log_{10} cycles of cell damage of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium, respectively, after PEF treatments of different field strengths and pH at a constant treatment time (i.e. 100 μ s). In these figures, the number of damaged cells has been calculated by subtracting the \log_{10} cycles of inactivation estimated in non-selective and selective media with the corresponding tertiary models. PEF treatments induced more damage in *E. coli* O157:H7 than in *Salmonella* Typhimurium cells. In *E. coli* O157:H7, cell damage increased with the electric field strength except in the range of pH between 5.5 and 6.5 (Fig. 6A). For *Salmonella* Typhimurium (Fig. 6B), the maximum cell damage was estimated in media of pH 3.5 at 25 kV/cm (1.5 \log_{10} cycles). No damage or hardly

Table 1

δ and p values from the fitting of the mathematical model based on the Weibull distribution to the survival curves of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878 treated by PEF and recovered in non-selective and selective media.

Escherichia coli O157:H7									
Non-selective media						Selective media			
E	pH	p (CL 95%)	δ (CL 95%)	R^2	RMSE	p (CL 95%)	δ (CL 95%)	R^2	RMSE
15	3.5	0.13 (0.48–0.21)	>501	0.96	0.03	0.56 (0.35–0.77)	210.9 (149.5–272.2)	0.95	0.13
	4.5	0.19 (0.07–0.30)	>501	0.93	0.02	0.19 (0.11–0.25)	>501	0.97	0.04
	5.5	0.48 (0.32–0.64)	225.2 (149.1–301.2)	0.95	0.14	0.57 (0.43–0.70)	155.1 (118.8–191.3)	0.98	0.10
	7.0	0.27 (0.06–0.47)	>501	0.92	0.13	0.33 (0.11–0.54)	260.7 (95.5–425.9)	0.89	0.16
20	3.5	0.31 (0.15–0.46)	>501	0.89	0.04	0.21 (0.13–0.28)	388.7 (208.4–568.9)	0.97	0.06
	4.5	0.13 (0.05–0.19)	>501	0.95	0.06	0.29 (0.17–0.39)	74.25 (34.32–114.2)	0.96	0.13
	5.5	0.43 (0.33–0.52)	28.69 (13.70–43.68)	0.98	0.16	0.42 (0.32–0.51)	18.01 (6.69–29.32)	0.98	0.19
25	7.0	0.68 (0.52–0.89)	157.9 (108.1–207.7)	0.97	0.16	0.58 (0.49–0.66)	48.62 (34.36–62.87)	0.99	0.13
	3.5	0.21 (0.13–0.27)	>501	0.96	0.05	0.54 (0.34–0.73)	55.04 (18.68–91.39)	0.96	0.26
	4.5	0.71 (0.48–0.94)	185.7 (112.1–259.3)	0.95	0.21	0.64 (0.36–0.91)	46.59 (5.54–97.63)	0.94	0.43
	5.5	0.30 (0.14–0.44)	4.213 (0.269–13.70)	0.91	0.53	0.34 (0.18–0.49)	5.24 (0.96–14.44)	0.94	0.43
30	7.0	0.78 (0.53–1.03)	141.7 (74.98–208.4)	0.96	0.28	0.75 (0.63–0.85)	57.31 (41.5–73.09)	0.99	0.15
	3.5	0.90 (0.62–1.16)	179.8 (110.8–248.8)	0.97	0.21	0.34 (0.14–0.54)	2.85 (0.49–10.18)	0.91	0.40
	4.5	0.55 (0.41–0.68)	77.37 (38.67–116.1)	0.98	0.19	0.41 (0.20–0.60)	9.36 (0.05–28.26)	0.93	0.53
	5.5	0.25 (0.17–0.32)	1.15 (–0.76–3.07)	0.96	0.32	0.21 (0.08–0.34)	0.23 (0.07–1.18)	0.93	0.41
35	7.0	0.64 (0.40–0.88)	62.52 (11.03–114.0)	0.95	0.46	0.69 (0.58–0.79)	38.21 (24.77–51.71)	0.99	0.19
	3.5	0.75 (0.52–0.98)	99.48 (44.90–157.1)	0.96	0.34	0.34 (0.15–0.52)	2.57 (0.08–8.92)	0.92	0.45
	4.5	0.56 (0.44–0.66)	57.88 (32.01–83.75)	0.98	0.21	0.41 (0.34–0.46)	8.33 (3.89–12.76)	0.99	0.17
	5.5	0.25 (0.10–0.39)	0.69 (–1.76–3.12)	0.89	0.52	0.22 (0.03–0.41)	0.17 (0.01–1.17)	0.87	0.55
7.0	0.65 (0.46–0.83)	35.39 (12.15–58.63)	0.97	0.34	0.51 (0.31–0.71)	14.71 (0.12–32.40)	0.95	0.52	

E: electric field strength (kV/cm); p : shape parameter; δ : scale parameter (μ s); CL 95%: confidence limit; R^2 : determination coefficient; RMSE: root mean square error.

Salmonella Typhimurium 878									
Non-selective media						Selective media			
E	pH	p (CL 95%)	δ (CL 95%)	R^2	RMSE	p (CL 95%)	δ (CL 95%)	R^2	RMSE
15	3.5	0.23 (0.15–0.32)	197.5 (129.3–265.8)	0.96	0.08	0.21 (0.18–0.24)	15.89 (11.49–20.29)	0.99	0.04
	4.5	0.24 (0.24–0.30)	185.9 (168.1–203.7)	0.99	0.02	0.21 (0.16–0.28)	24.61 (5.91–43.31)	0.97	0.12
	5.5	0.32 (0.13–0.53)	51.01 (1.10–112.1)	0.89	0.33	0.22 (0.13–0.29)	9.39 (2.31–21.11)	0.93	0.26
	7.0	0.46 (0.41–0.57)	112.6 (96.8–128.4)	0.99	0.06	0.20 (0.11–0.33)	30.16 (1.54–72.86)	0.91	0.27
20	3.5	0.26 (0.21–0.32)	6.15 (0.22–10.16)	0.99	0.13	0.15 (0.07–0.19)	0.04 (0.01–0.19)	0.96	0.29
	4.5	0.32 (0.20–0.44)	22.32 (0.65–45.31)	0.94	0.26	0.21 (0.18–0.24)	0.78 (0.20–0.24)	0.99	0.09
	5.5	0.23 (0.15–0.30)	5.03 (0.03–11.10)	0.97	0.15	0.21 (0.16–0.27)	2.81 (0.11–5.51)	0.98	0.12
25	7.0	0.36 (0.23–0.53)	37.55 (7.09–68.01)	0.95	0.26	0.20 (0.14–0.26)	2.67 (0.01–6.16)	0.90	0.42
	3.5	0.26 (0.16–0.35)	1.94 (0.84–5.30)	0.95	0.35	0.14 (0.11–0.16)	0.01 (0.001–0.015)	0.99	0.10
	4.5	0.27 (0.19–0.77)	4.54 (–0.46–9.55)	0.97	0.26	0.14 (0.08–0.19)	0.01 (0.01–0.06)	0.98	0.22
	5.5	0.09 (0.01–0.11)	0.07 (0.02–0.15)	0.97	0.24	0.17 (0.05–0.52)	0.05 (0.01–0.08)	0.94	0.31
30	7.0	0.34 (0.27–0.43)	7.45 (2.19–12.71)	0.98	0.18	0.21 (0.02–0.50)	0.45 (0.04–1.04)	0.95	0.33
	3.5	0.27 (0.11–0.43)	2.00 (0.08–7.81)	0.89	0.55	0.12 (0.05–0.22)	0.02 (0.01–0.03)	0.96	0.31
	4.5	0.22 (0.12–0.30)	0.41 (0.07–1.53)	0.94	0.42	0.13 (0.09–0.16)	0.001 (0.003–0.005)	0.99	0.17
	5.5	0.11 (0.07–0.14)	0.03 (0.01–0.05)	0.98	0.18	0.14 (0.10–0.16)	0.003 (0.001–0.013)	0.99	0.15
35	7.0	0.23 (0.15–0.29)	1.09 (0.02–2.56)	0.98	0.23	0.16 (0.11–0.30)	0.16 (0.08–0.25)	0.97	0.32
	3.5	0.17 (0.06–0.27)	0.03 (0.004–0.201)	0.91	0.48	0.17 (0.15–0.18)	0.01 (0.01–0.02)	0.95	0.34
	4.5	0.20 (0.14–0.25)	0.08 (0.007–0.248)	0.97	0.22	0.21 (0.17–0.24)	0.08 (0.02–0.21)	0.99	0.17
	5.5	0.16 (0.11–0.20)	0.02 (0.009–0.047)	0.97	0.27	0.14 (0.08–0.20)	0.01 (0.001–0.03)	0.97	0.27
7.0	0.19 (0.10–0.26)	0.07 (0.001–0.326)	0.95	0.35	0.17 (0.14–0.21)	0.03 (0.02–0.04)	0.99	0.12	

E: electric field strength (kV/cm); p : shape parameter; δ : scale parameter; CL 95%: confidence limit; R^2 : determination coefficient; RMSE: root mean square error.

any damage was estimated when pH was over 5.5 at all electric field strengths investigated for these microorganisms.

4. Discussion

In this study, it has been systematically investigated for first time the influence of the pH of the treatment medium and the occurrence of sublethal injury in a wide range of field strengths and treatment times in two Gram negative pathogenic bacteria, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878. These strains have been selected for this investigation due to their high PEF resistance (Saldaña et al., 2009). This study demonstrates that when the influence of several factors on the microbial behavior is investigated, the development of mathematical models is a very useful tool to evaluate the influence of each parameter and their interactions (McMeekin & Ross, 2002). These models would also be of interest for engineering design, evaluation and optimisation of PEF process as a new technique for

food preservation (Gómez, García, Álvarez, Raso, et al., 2005; McDonal & Sun, 1999).

When microbial inactivation does not follow first-order kinetics, the use of the primary model based on the Weibull frequency distribution has gained wide acceptance because of its simplicity and flexibility. In the last years, this model has been successfully used to describe survival curves corresponding to microbial inactivation by PEF (Álvarez et al., 2006; Gómez, García, Álvarez, Condón, & Raso, 2005; Lebovka & Vorobiev, 2004; Pérez et al., 2007; Puértolas et al., 2009; Rivas, Sampedro, Rodrigo, Martínez, & Rodrigo, 2006; Rodrigo, Martínez, Harte, Barbosa-Cánovas, & Rodrigo, 2001; Rodrigo et al., 2003; Sampedro, Rivas, Rodrigo, Martínez, & Rodrigo, 2006). In some of these studies, simple relationships have been observed between the model parameters and factors affecting microbial resistance; in others, these relationships were more complex. Generally, this complexity depends on the microorganisms and increases with the number of processing variables investigated and the experimental range

Table 2

Significant variables and their interactions for polynomial equations of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878 treated by PEF and recovered in non-selective and selective media.

	<i>E. coli</i> non-selective media	<i>E. coli</i> selective media	<i>Salmonella</i> Typhimurium non-selective media	<i>Salmonella</i> Typhimurium selective media
	Coefficient	Coefficient	Coefficient	Coefficient
Intercept	-42.0281	4.278	8.08	6.6513
<i>E</i>	0.4589	-	-0.407	-0.5580
pH	31.7855	-	-0.517	-
<i>E</i> ²	-	-0.00226	0.00535	0.009002
pH ²	-6.0850	0.03544	0.038	-
<i>E</i> ³	0.000253	-	-	-
pH ³	0.3657	-	-	-
<i>E</i> ² pH	-0.5131	-0.0466	0.00421	-
<i>E</i> ² *pH	0.00966	0.00106	-	-
<i>E</i> ² pH ²	0.0519	-	-	0.00259
<i>E</i> ² *pH ²	-0.00096	-	-	0.0000652
RMSE	0.281	0.452	0.395	0.300
R ² adj	0.916	0.895	0.897	0.926

R² adj: adjusted *R*-squared; RMSE: root mean square error.

considered. In this investigation, while the tertiary model for *Salmonella* Typhimurium was relatively simple because the shape factor was independent of electric field strength and pH, that for *E. coli* O157:H7 in non-selective media was more complex since the *p* value depended on the processing variables. This complexity could be a limitation of the Weibull model to easily establish the treatment conditions to assure food safety. Therefore, the adoption of these models by the food industry will require the development of user-friendly application software that makes it easier for industrial technicians to employ mathematical models.

In this study, for first time the Weibull model has been useful to describe the survival curves when microorganisms were recovered in selective media and therefore to quantify the sublethal injury caused by PEF. Based on the Weibull model and the corresponding secondary models, tertiary models were developed which have been used to interpret the interactions among process parameters (field strength and treatment time) and environmental variables (pH and recovery conditions). These models also have permitted to compare the response to PEF between different microorganisms and to establish the combinations in which larger inactivation or cell damage were generated (Figs. 5 and 6).

The lethality increased with electric field strength and treatment time in *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878 similarly to that observed in other bacteria (Álvarez et al., 2006; Fleischman, Ravishankar, & Balasubramaniam, 2004; Nguyen & Mittal, 2007; Rodríguez-Calleja et al., 2006; Sampedro, Rivas, Rodrigo, Martínez, & Rodrigo, 2007; Somolinos et al., 2008).

The influence of the pH of the treatment medium on the PEF sensitivity depended on the microorganism investigated. While the PEF resistance of *Salmonella* Typhimurium was hardly influenced by the pH of the treatment medium (Figs. 1B and 5B), PEF resistance was higher at lower pH than at neutral pH for *E. coli* O157:H7 (Figs. 1A and 5A). A lack of influence of the pH of the treatment medium on the inactivation of *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Bacillus subtilis* has also been reported (Álvarez, Raso, Sala, & Condón, 2003; Heinz & Knorr, 2000; Hulsheger, Potel, & Niemann, 1981; Sale & Hamilton, 1967). However, it has been generally observed that Gram negative bacteria show lower PEF sensitivity in acidic conditions (Álvarez, Raso, Palop, & Sala, 2000; García, Gómez, Mañas, et al., 2005; García, Gómez, Raso, et al., 2005). Our results confirm these observations, especially for *E. coli* O157:H7. Although these microorganisms show a high PEF resistance at lower pH, this resistance dramatically decreased when microorganisms were recovered in selective media (see as an example PEF treatments at 30 and 35 kV/cm in Fig. 2A). This

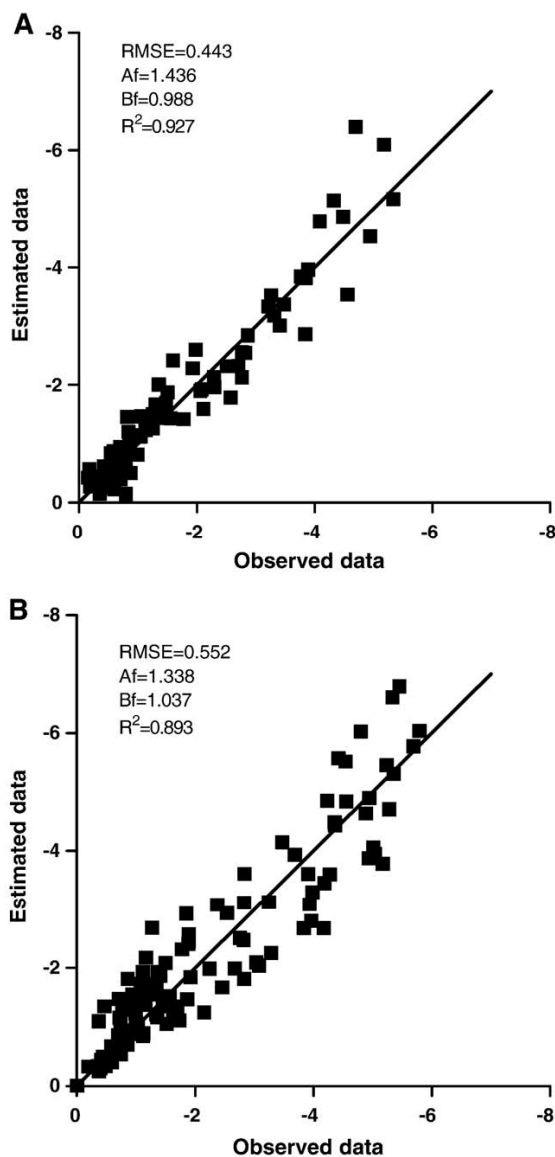


Fig. 3. Correlation between experimental and estimated data obtained with the tertiary models for *E. coli* O157:H7 treated by pulsed electric fields and recovered in non-selective (A) and selective media (B).

would indicate that cells are affected by the PEF treatments in some way, but not sufficiently to induce their death if recovery conditions are adequate. This higher PEF resistance in acidic media has been attributed to a higher capability of damaged cells to recover after PEF treatments in media of low pH (García et al., 2003).

Results obtained in this investigation show that *E. coli* O157:H7 was more PEF resistant than *Salmonella* Typhimurium (Fig. 5). The high PEF resistance of *E. coli* O157:H7 in media of pH ranging from 3.5 to 4.5 is similar to that reported in literature for other PEF resistant microorganisms such as *Listeria monocytogenes* in media of pH 7.0 (Álvarez et al., 2006; Gómez, García, Álvarez, Condón, et al., 2005; Wouters, Álvarez, et al., 2001).

The data obtained in this investigation and the developed models have permitted to detect that the highest PEF sensitivity of two Gram negative strains, mainly in *E. coli* O157:H7, was in the range of pH 5.5

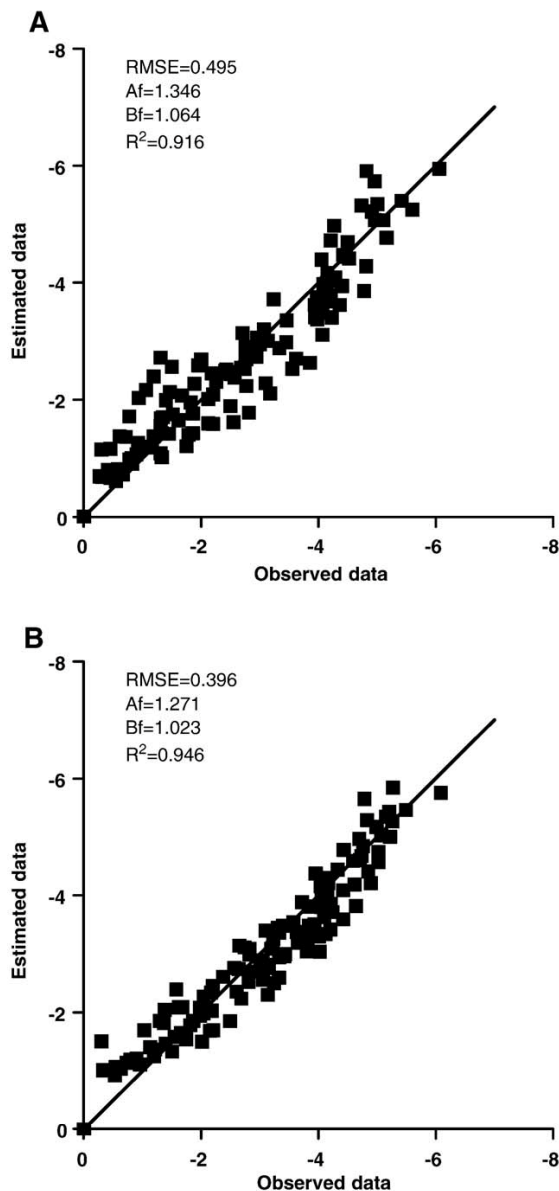


Fig. 4. Correlation between experimental and estimated data obtained with the tertiary models for *Salmonella* Typhimurium 878 treated by pulsed electric fields and recovered in non-selective (A) and selective media (B).

to 6.5. This behavior has never been reported and it would be required a detailed study to identify the mechanisms involved.

The occurrence of cell damage after PEF treatments has already been described in literature (García et al., 2003; García, Gómez, Mañas, et al., 2005; Somolinos et al., 2008) and this effect generally depended on the PEF treatment conditions and pH. It is generally reported that the cell damage in Gram negative bacteria occurs in media of low pH but not at pH 7.0 (García, Gómez, Mañas, et al., 2005; Russell, Colley, Simpson, Trivett, & Evans, 2000; Simpson, Whittington, Earnshaw, & Russell, 1999; Somolinos et al., 2008). However, these observations have been obtained by end point methods based on the determination of the effect produced by a given electric field strength and treatment time. Analysis of one end point does not provide sufficient information on the influence of the different factors on the

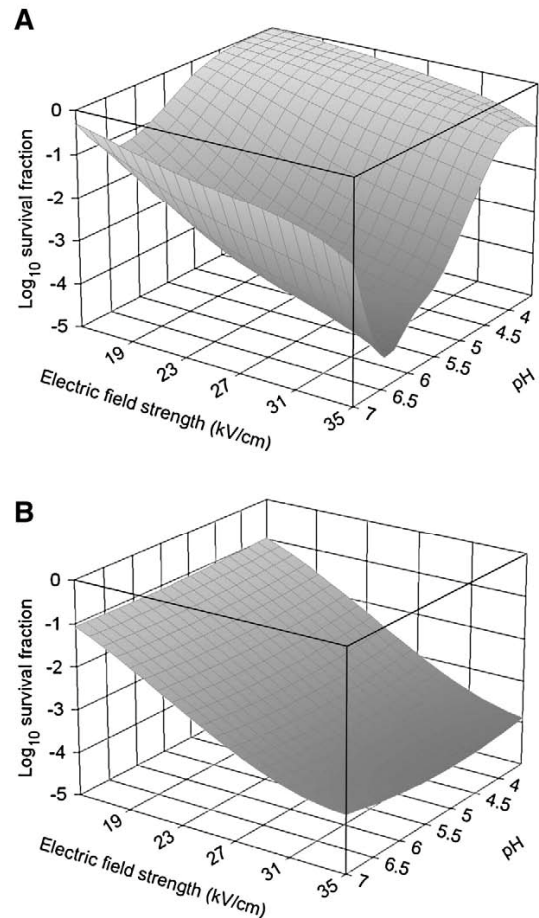


Fig. 5. Three-dimensional views of the influence of the electric field strength and pH on the inactivation of *E. coli* O157:H7 (5A) and *Salmonella* Typhimurium 878 (5B) after PEF treatments of 100 μ s.

occurrence of sublethal injury. In this investigation, the developed models have permitted to quantify the number of injured cells and to identify the PEF treatment conditions at different pH in which sublethal injury occurs.

The high PEF resistance of the two Gram negative pathogenic bacteria showed in this investigation mainly at low pH could limit the possibilities of PEF technology as a non-thermal pasteurization process for acid foods. However, the occurrence of sublethal injury after the application of PEF treatments opens the possibility of designing combining processes. It is well known that damaged microorganisms become more exacting in growth requirements and are more sensitive to other preservation factors (Mackey, 2000). Several authors have combined the application of PEF treatments with the addition of antimicrobials (i.e. nisin, sorbic acid) or with the storage at cooling temperatures, demonstrating that these combinations limited the recovery capability of damaged cells and thus increased the lethality of PEF (García, Hassani, Mañas, Condón, & Pagán, 2005; Saulis & Wouters, 2007; Somolinos, García, Condón, Mañas, & Pagán, 2007; Somolinos et al., 2008).

In conclusion, it has been demonstrated the possibility to model not only the microbial PEF inactivation but also the occurrence of sublethal injury after PEF treatments in two pulsed electric field-resistant Gram negative pathogenic bacteria in the range of pH of most of the foods. The developed mathematical equations could be used as an approach to define PEF pasteurization treatments in liquid

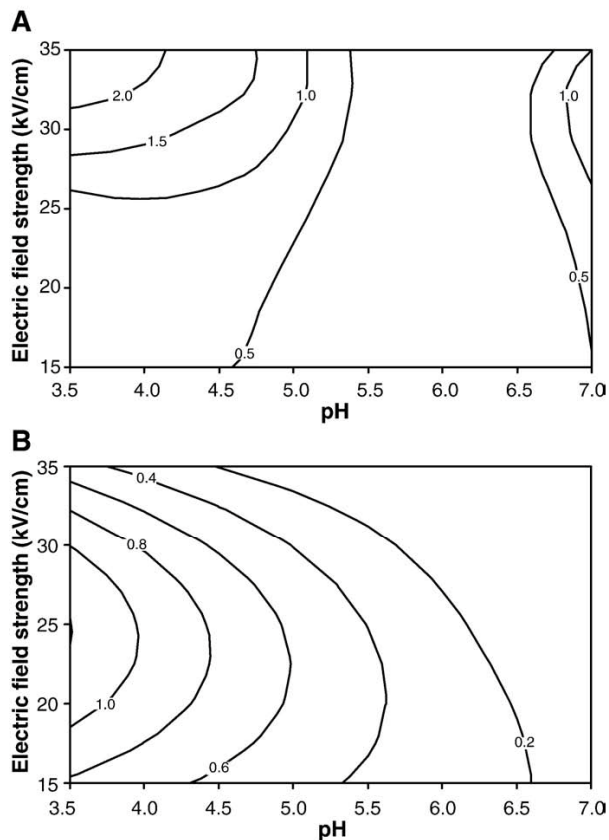


Fig. 6. Fitted iso- \log_{10} cycles of cell damage contour plots of *E. coli* O157:H7 (6A) and *Salmonella* Typhimurium 878 (6B) after PEF treatments of 100 μ s at different electrical field strengths and pH. The iso- \log_{10} cycles lines of cell damage has been developed by subtracting the \log_{10} cycles of inactivation estimated in non-selective and selective media with the corresponding tertiary model.

foods and to develop combined processes conducted to increase the lethality of PEF based on the higher sensitivity of damaged cells to the preservation factors.

Acknowledgements

G.S. and E.P. gratefully acknowledged the financial support for their doctoral studies from the Department of Science, Technology and University of the Aragon Government and the Spanish Ministry for Education and Science. This investigation has been funded by the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ). We gratefully acknowledge Glenn Richardson the review of the English language.

References

- Álvarez, I., Condón, S., & Raso, J. (2006). Microbial inactivation by pulsed electric fields. In J. Raso, & V. Heinz (Eds.), *Pulsed electric fields technology for the food industry: Fundamentals and applications* (pp. 97–129). New York: Springer.
- Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., & Raso, J. (2003). 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., Raso, J., Palop, A., & Sala, F. J. (2000). Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 143–146.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J., & Condón, S. (2003). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20, 691–700.
- Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., & Raghavan, G. S. V. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 79, 689–694.

- Anonymous (2002). *Salmonella* Annual Summary. (2002). Atlanta, Georgia 30333: Department of Health and Human Services – Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Foodborne and Diarrheal Diseases Branch.
- Arnoldi, A., Resta, D., Brambilla, F., Boschin, G., D'Agostina, A., Sirtori, E., et al. (2002). Parameters for the evaluation of the thermal damage and nutraceutical potential of lupin-based ingredients and food products. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(4), 431–436.
- Baranyi, J., Pin, C., & Ross, T. (1999). Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 159–166.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pierson, M. D., Zhang, Q. H., & Schaffner, D. W. (2001). Pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 65–79 Supplement.
- Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, J., & Crick, E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, 111, 439–447.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., & Sala, F. J. (1996). Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 149–152.
- Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H., & Jones, K. M. (1974). pH and buffers. *Data for Biochemical Research* (pp. 475–508). Oxford: CRC Press.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Journal of Food Microbiology*, 14(4), 273–285.
- Fleischman, G. J., Ravishankar, S., & Balasubramanian, V. M. (2004). The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology*, 21, 91–95.
- García, D., Gómez, N., Condón, S., Raso, J., & Pagán, R. (2003). Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 140–144.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., & Pagán, R. (2005). Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 94–104.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Raso, J., & Pagán, R. (2007). Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 219–227.
- García, D., Gómez, N., Raso, J., & Pagán, R. (2005). Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 388–395.
- García, D., Hassani, M., Mañas, P., Condón, S., & Pagán, R. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Safety*, 25, 30–42.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Condón, S., & Raso, J. (2005). Modeling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 199–206.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Raso, J., & Condón, S. (2005). A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *International Journal of Food Engineering*, 7, 7–14.
- Heinz, V., & Knorr, D. (2000). Effect of pH, ethanol addition and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus subtilis* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 151–159.
- Hulsheger, H., Potel, J., & Niemann, E. G. (1981). Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiation and Environmental Biophysics*, 20, 53–65.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433–440.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2003). Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2223–2229.
- Lebovka, N. I., & 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.
- Mackey, B. (2000). Injured bacteria. In M. L. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The microbiological safety and quality of foods* (pp. 315–341). Gaitersburg: Aspen Publisher.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107–113.
- Mañas, P., & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387–1399.
- McDonal, K., & Sun, D. (1999). Predictive microbiology for the food industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 1–27.
- McMeekin, T. A., & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133–153.
- Ng, T. M., & Schaffner, D. W. (1997). Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1237–1243.
- Nguyen, P., & Mittal, G. S. (2007). Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 360–365.
- 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 Science and Technology International*, 4, 33–44.
- Pérez, M. C. P., Aliaga, D. R., Bernat, C. F., Enguidanos, M. R., & López, A. M. (2007). Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal*, 17, 1441–1449.

- Plym Forshell, L., & Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. Scientific and Technical Review. *OIE World Organisation for Animal Health*, 25, 541–554.
- Pol, I. E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E., & Smid, E. J. (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1012–1018.
- Puértolas, P., López, N., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 49–55.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., & Sala, F. J. (2000). Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 21–30.
- Rivas, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2006). 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., 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 kinetics models. *Journal of Food Protection*, 64(2), 259–263.
- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Cánovas, G. V., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2003). Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 223–229.
- Rodríguez-Calleja, J. M., Cebrián, G., Condón, S., & Mañas, P. (2006). Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1054–1062.
- Russell, N. J., Colley, M., Simpson, R. K., Trivett, A. J., & Evans, R. I. (2000). Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacteria is an "all-or-nothing" effect. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 133–136.
- Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, 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, 160–165.
- Sale, A. J. H., & Hamilton, W. A. (1967). Effect of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 148, 781–788.
- 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.
- Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2007). 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.
- Saulis, G., & Wouters, P. C. (2007). Probable mechanisms of microorganism inactivation by pulsed electric fields. In H. L. M. Lelieveld, S. Notermans, & S. W. H. de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields. From research to application* (pp. 138–155). Boca Raton: CRC Press.
- Simpson, R. K., Whittington, R., Earnshaw, R. G., & 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. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 1–10.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mañas, P., & Pagán, R. (2007). Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3814–3821.
- Somolinos, M., García, D., Mañas, P., Condón, S., & 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*. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 260–267.
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2), 356–634.
- Wheeler, J. G., Sethi, D., Cowden, J. M., Wall, P. G., Rodrigues, L. C., Tompkins, D. S., et al. (1999). Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *British Medical Journal*, 318, 1046–1050.
- Wouters, P., Álvarez, I., & Raso, J. (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Science and Technology*, 12, 112–121.
- Wouters, P. C., Bos, A. P., & Ueckert, J. (2001). Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Applied Environmental Microbiology*, 67(7), 3092–3101.
- Zhao, T., Doyle, M. P., & Besler, R. E. (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2526–2530.

Manuscrito III



Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of different pH

G. Saldaña, E. Puértolas, S. Condón, I. Álvarez, J. Raso*

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50.013 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2009
Received in revised form
14 January 2010
Accepted 17 January 2010
Available online 25 January 2010

Keywords:

PEF
Pasteurization
L. monocytogenes
S. aureus
Target microorganism

ABSTRACT

A study of the effect of pulsed electric fields (PEF) on the inactivation of *Listeria monocytogenes* STCC 5672 and *Staphylococcus aureus* STCC 4459 in McIlvaine buffer covering a range from pH 3.5 to 7.0 was conducted. Mathematical models based on the Weibull distribution were developed to describe the influence of the electric field strength, treatment time and pH of the treatment medium on the lethality of both Gram positive pathogenic bacteria after PEF treatments. Both microorganisms were more sensitive to PEF in media of low pH, although the influence of the pH on the PEF resistance was more significant in *S. aureus*. In the best cases scenario, the highest inactivation levels achieved were 3.3 and 6.1 log₁₀ cycles for *L. monocytogenes* and *S. aureus* respectively in pH 3.5 after 500 μs of 35 kV/cm. Based on these results and those observed in literature, *L. monocytogenes* STCC 5672 at any pH investigated has been shown as one of the most PEF resistant microorganism. Therefore, this microorganism should be considered as a possible target microorganism to define process criterion for PEF pasteurization.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, the consumer's demand for fresher foods requires food preservation methods with a very limited impact on the sensorial and nutritional qualities of the products. In turn, this is promoting the development of new nonthermal preservation techniques, such as pulsed electric fields (PEF) (Barbosa-Cánovas et al., 2005). The process consists of the application of short duration pulses (1–100 μs) of a high electric field (5–50 kV/cm) to food placed between two electrodes. It has been widely demonstrated that these treatments induce the disruption of microbial cell membranes and causes the inactivation of microorganisms (Wouters et al., 2001). PEF is an effective treatment for inactivating vegetative cells of bacteria and yeast without altering sensorial and nutritional properties of foods (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Raso and Heinz, 2006). However, as bacterial spores are resistant to PEF treatments, the main applications of this technology for food preservation must be focused on pasteurization (Pagán et al., 1998; Pol et al., 2001).

In order to establish the treatment conditions for food pasteurization by PEF, it is necessary to identify the most PEF resistant microorganisms of public health concern for each specific food product. Once the target pathogenic microorganisms have been identified, the influence of environmental factors on the microbial

inactivation, including process parameters and treatment medium characteristics, and the knowledge of the kinetics of inactivation have to be evaluated.

Several investigations have been done related to the lethal effect of PEF treatments on different microorganisms (Wouters et al., 2001; Álvarez et al., 2006; Mosqueda-Melgar et al., 2008). However, up to now, there has not been proposed target microorganisms to which refer the *process criterion* (treatment conditions required to obtain a predetermined number of log₁₀ reductions of the target pathogenic microorganism – *performance criterion* – van Schothorst, 1998; Stewart et al., 2002) for PEF pasteurization. The great variability observed on the PEF resistance among strains of the same microorganism, depending on the pH of the treatment medium and/or the intensity of the PEF treatments, jointly with the broad experimental conditions and the diversity of apparatus used in different laboratories, have limited the identification of target microorganisms. Therefore it is necessary to accumulate data on the critical factors affecting microbial inactivation of the most PEF resistant pathogenic bacteria and to describe their PEF inactivation kinetics obtained under similar experimental conditions. Previous studies done in our laboratory have permitted to identify among 20 microorganisms the most PEF resistant strains of four pathogenic microorganisms (*Salmonella Typhimurium* STCC 878 and *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* STCC 5672 and *Staphylococcus aureus* STCC 4459) in media of pH 4.0 and 7.0 after different PEF treatments (Saldaña et al., 2009). In a second approach, it has been mathematically described the influence of the pH (from 3.5 to 7.0) on the

* Corresponding author. Tel.: +34 976 76 1581; fax: +34 976 76 15 90.
E-mail address: jraso@unizar.es (J. Raso).

inactivation kinetics of Gram negative bacteria (*Salmonella Typhimurium* STCC 878, *E. coli* O157:H7) in a wide range of PEF treatments (electric field strength and treatment time) (Saldaña et al., in press). With the present investigation, it is concluded the study of the influence of the pH of the treatment medium on the kinetics of inactivation by PEF on the Gram positive pathogenic strains most PEF resistant (*L. monocytogenes* STCC 5672 and *S. aureus* S5TC 4459).

L. monocytogenes is a Gram positive, nonsporeforming, facultatively anaerobic, psychrotrophic microorganism that in the past few decades has emerged as a foodborne pathogen of major significance. The ability of these bacteria to grow over a wide temperature range in acidic environments, as well as in the absence of or at very low amounts of O₂ enables it to multiply in many environments (Gandhi and Chikindas, 2007). Although most cases of human listeriosis appear to be sporadic, *L. monocytogenes* has become a serious public health concern because of its high mortality rate (Farber and Peterkin, 2000). Infection has been associated with a variety of foods, including juices, cheese, meat, milk, vegetables and fish (de Valk et al., 2005; Makino et al., 2005; Vojdani et al., 2008).

S. aureus is a Gram positive, nonsporeforming, facultatively anaerobic, mesophilic bacteria. Staphylococcal food poisoning results from the growth of enterotoxigenic staphylococci in foods and the production of enterotoxins, which induces symptoms similar to acute gastroenteritis (Baird-Parker, 2000). Foods including bakery products containing custards or cream, ham, poultry products, milk and milk products, juices and eggs have frequently been reported to be involved in outbreaks of staphylococcal intoxication (Baird-Parker, 2000). Despite the frequent isolation of *S. aureus* as causative agent of food poisoning in almost every part of the world (Baird-Parker, 2000), the resistance of this microorganism to several preservation technologies has been scarcely investigated, especially in the case of emerging technologies (Cebrián et al., 2007). Moreover, little is known about the influence of environmental factors such as pH of the treatment medium on the kinetics of inactivation of *S. aureus* by pulsed electric fields.

In this study it has been investigated the influence of the pH of the treatment medium in a wide range of field strengths and treatment times in *L. monocytogenes* STCC 5672 and *S. aureus* S5TC 4459. This study will permit to generate predictive equations to describe the inactivation of PEF resistant strains of Gram positive pathogenic bacteria (Saldaña et al., 2009). With these equations and those already published for other Gram negative and positive pathogenic bacteria, the final goal of this investigation is to identify possible target microorganisms for microbial PEF inactivation and to determine the potential lethality of PEF on pathogenic bacteria in media of different pH.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

The strains of *L. monocytogenes* (STCC 5672) and *S. aureus* (STCC 4459) were supplied by the Spanish Type Culture Collection (STCC). Broth subcultures were prepared by inoculating 5 mL Tryptic Soy Broth (Biolife, Milan Italy) plus 0.6% (w/v) of Yeast Extract (Biolife) (TSBYE) with a single colony and incubated for 18 h at 37 °C. With this subculture, flasks containing 50 mL of prewarmed TSBYE were inoculated to a final concentration of approximately 10⁶ CFU/mL. The cultures were incubated under agitation at 37 °C until the stationary growth phase was reached, 24 h (Saldaña et al., 2009).

2.2. PEF equipment

PEF equipment used in this investigation was supplied by ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden). The

apparatus generates square waveform pulses of a width of 3 μs with a frequency up to 300 Hz. The maximum output voltage and current were 30 kV and 200 A, respectively. The equipment consists of a direct current power supply (DCPS) which converts the 3-phase line voltage to a regulated DC voltage. It charges up 6 IGBT switching modules (high-power solid-state switches) to a primary voltage around 1000 V. An external trigger pulse gates all the modules and controls its discharge to a primary pulsed signal of around 1000 V. Finally, a pulse transformer transforms this primary 1000 V pulse to a high voltage pulse of desired high voltage.

Microorganisms were treated in a static parallel-electrode treatment chamber with a distance between electrodes of 0.25 cm and an area of 2.01 cm². With an electrical conductivity of the sample of 0.10 S/m at 20 °C the ohmic resistance of the treatment chamber is 124 Ω. Actual electric field strength applied and pulse width were measured in the treatment chamber with a high voltage probe connected to an oscilloscope (Tektronix, TDS 220, Wilsonville, OR). Treatment time was calculated by multiplying the pulse width (τ) by the number of pulses applied. The frequency of the pulses was controlled by an external function generator (Tektronix, AFG 320, Wilsonville, OR). The energy per pulse (W') was calculated by the following equation:

$$W' = \int_0^{\infty} k \cdot E(t)^2 dt$$

where *k* (S/m) is the electrical conductivity of the treatment medium; *E* (V/m) is the electric field strength; and *t*(s) is the duration of the pulse. The total energy (kJ) applied (*W*) was calculated by multiplying the energy per pulse (*W'*) by the number of pulses. The total specific energy (kJ/kg) applied (*W*) was determined by dividing the total energy by the mass of treated medium. The temperature of the treatment medium was measured as previously described Raso et al. (2000).

2.3. Microbial inactivation experiments

Before treatment, microorganisms were centrifuged at 6000 × *g* for 5 min at 4 °C and re-suspended in citrate-phosphate McIlvaine buffer of different pH (3.5, 4.5, 5.5 and 7.0) (Dawson et al., 1974) which concentration was adjusted to an electrical conductivity of 0.10 ± 0.01 S/m. This range of pH was used since it permitted to cover the pH of different liquid foods. The microbial suspension (0.5 mL) at a concentration of approximately 10⁸ CFU/mL was placed into the treatment chamber with a sterile syringe, as it has been previously described (Raso et al., 2000). Cumulative treatment times ranged from 15 to 501 μs and electric field strengths set at 15, 20, 25, 30 and 35 kV/cm which corresponded to specific energies per pulse of 0.7, 1.2, 1.9, 2.7 and 3.7 kJ/kg, respectively. A pulse frequency of 1 Hz was used. Under these conditions, the final temperature of the treatment media was always below 35 °C.

2.4. Enumeration of viable cells

PEF treated and control cell suspensions were serially diluted in 0.1% sterile peptone solution (Biolife). The medium used for enumeration of viable cells of all the strains was Tryptic Soy Agar (Biolife) plus 0.6% (w/v) of Yeast Extract (Biolife) (TSAYE). From the selected dilutions, 0.1 mL was pour plated into TSAYE and then plates were incubated at 37 °C for 48 h to detect viable cells. Longer incubation times did not increase the microbial counts. Colonies were counted with an improved image analyzer automatic counter (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK) as previously described Condón et al. (1996). Each experiment was performed twice on separate days and the average results are presented.

552

G. Saldaña et al. / Food Microbiology 27 (2010) 550–558

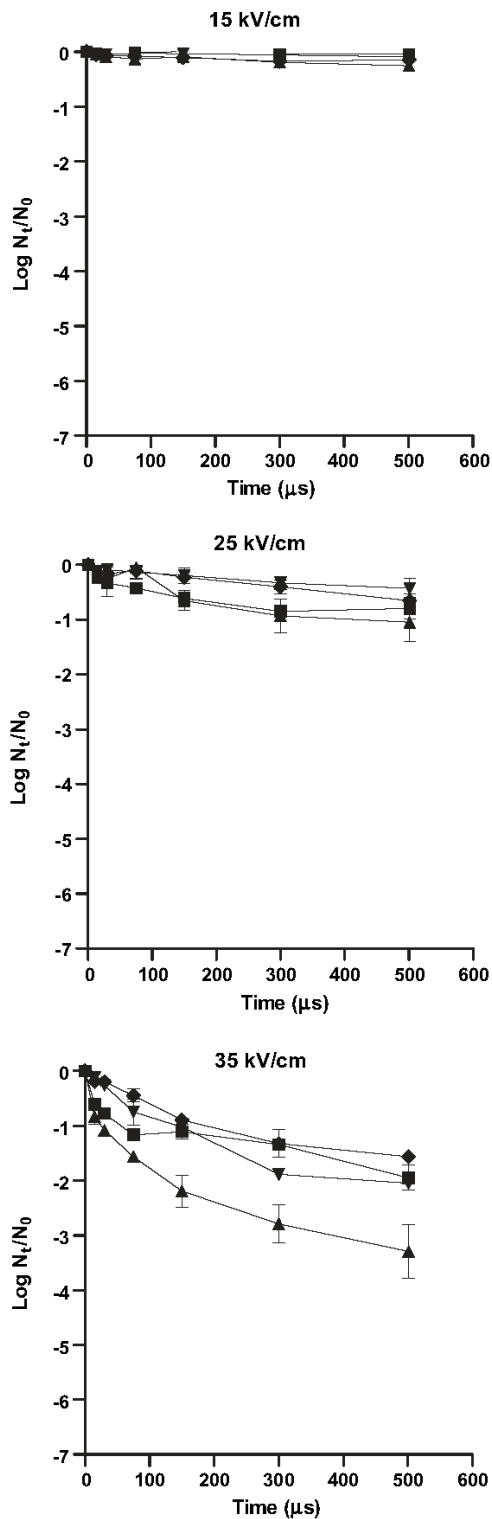


Fig. 1. Influence of the pH of the treatment medium on the inactivation of *L. monocytogenes* STCC 5672 treated by PEF at 35, 25 and 15 kV/cm. Treatment conditions: McIlvaine buffer of pH 7.0 (◆), 5.5 (▼), 4.5 (■), 3.5 (▲); 0.1 S/m; 1 Hz.

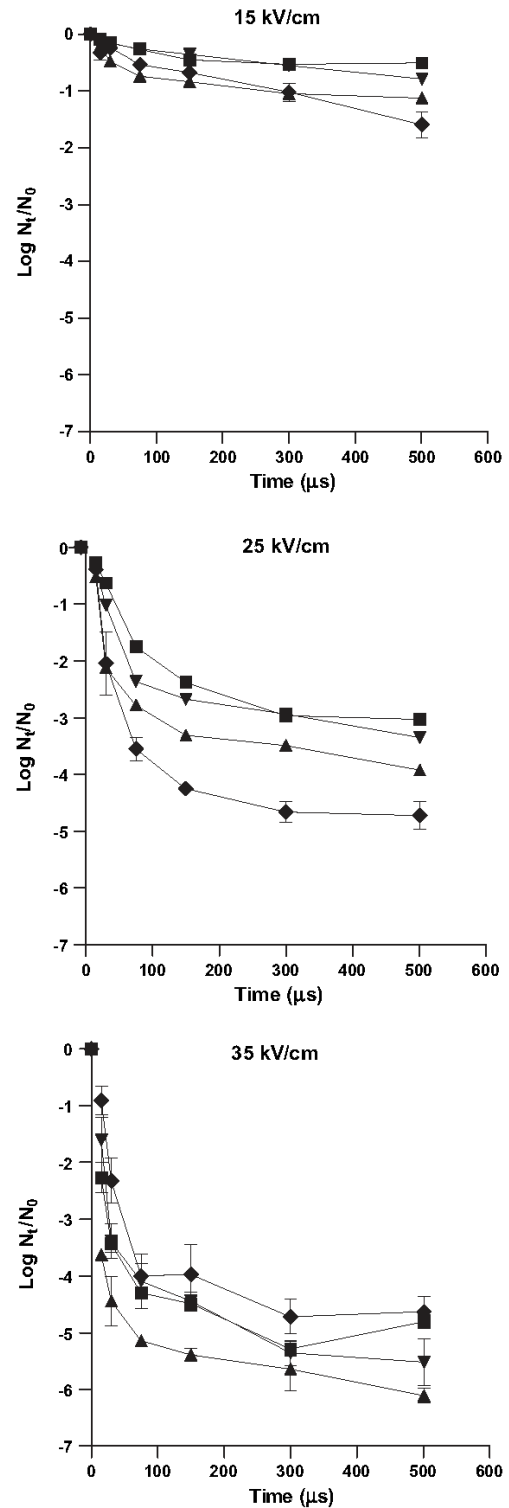


Fig. 2. Influence of the pH of the treatment medium on the inactivation of *S. aureus* STCC 4459 treated by PEF at 35, 25 and 15 kV/cm and recovered in non-selective (continuous line) and selective media (dotted line). Treatment conditions: McIlvaine buffer of pH 7.0 (◆), 5.5 (▼), 4.5 (■), 3.5 (▲); 0.1 S/m; 1 Hz.

2.5. Curve fitting

A mathematical equation based on the Weibull distribution was used to fit the survival curves of the different microorganisms:

$$\text{Log}_{10} \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \tag{1}$$

where N_t is the number of microorganisms that have survived to the treatment, N_0 is the initial number of the microbial population, t is the treatment time (in μs), and δ and p are respectively the scale and shape parameters. The δ value represents the treatment time necessary to inactivate the first log_{10} cycle of the microbial population. The p parameter accounts for upward concavity of a survival curve ($p < 1$), a linear survival curve ($p = 1$), and downward concavity ($p > 1$) (Mafart et al., 2002).

To determine the δ and p values, the least-squares criterion by the Solver function of the Excel 2007 package (Microsoft, Seattle, WA) and the GraphPad PRISM® (Graph Software, San Diego, CA) was used. The variability of the scale (δ value) and shape (p value) factors with the electric field strength and pH was studied by means of analysis of variance with GraphPad PRISM® ($p = 0.05$). The relationships among the estimated p values, the pH investigated and the electric field strength were modeled by the Gompertz function. Quadratic polynomial (response surface) equations for the effects of field strength and pH of the treatment medium on the estimated δ values were generated by Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, USA). Backward stepwise regression was used to eliminate the parameters which were not significant in the equation.

In order to determine the accuracy of the final equations, the RMSE (root mean square error), the bias (B_f) and the accuracy factors (A_f) were used (Baranyi et al., 1999). The bias factor indicates by how much on average, a model overpredicts (bias factor > 1) or underpredicts (bias factor < 1) the observed data. On the other hand, the accuracy factor indicates how many the estimated data differ from the observed ones.

3. Results

Figs. 1 and 2 illustrate the influence of the pH on the inactivation of *L. monocytogenes* (Fig. 1) and *S. aureus* (Fig. 2) by pulsed electric fields treatments. These figures show the survival curves (log_{10} cycles of the survival fraction versus treatment time) of these microorganisms in McIlvaine buffer of pH 7.0, 5.5, 4.5 and 3.5 at the lowest (15 kV/cm), medium (25 kV/cm) and the highest (35 kV/cm) electric field strengths investigated. At all pH investigated, treatments at electric field strengths lower than 20 kV/cm and 15 kV/cm scarcely affected viability of *L. monocytogenes* and *S. aureus* cells, respectively. At all field strengths investigated, both microorganisms were more sensitive to PEF in media of low pH. However, the reduction of the pH from 7.0 to 3.5 only increased the lethality a maximum of 1.9 and 1.4 log_{10} cycles for *L. monocytogenes* and

S. aureus respectively after the strongest PEF treatment applied (35 kV/cm and 501 μs).

Survival curves of both bacteria were concave upwards at any pH and electric field strength investigated. The microbial inactivation was faster at the first moments of the treatment, and then progressively declined. Survival curves showed in Figs. 1 and 2 were fitted to Eq. (1) (primary model). The estimated parameters δ and p obtained are shown in Table 1. RMSE and R^2 of the fits ranged from 0.01 to 0.44 and from 0.70 to 0.98, respectively.

The time to reduce 1 log_{10} cycle the population (δ value) of *L. monocytogenes* and of *S. aureus* was shorter at higher field strengths and at lower pH. The shape parameter (p value) was only influenced by the pH of the treatment medium. When the pH of the treatment medium varied from 7.0 to 3.5, the scale parameter decreased in *L. monocytogenes* from a mean of 0.733 to a mean of 0.477 and from 0.366 to 0.250 for *S. aureus*. For both microorganisms, the shape values were always lower than 1.

Equations describing how the parameters of the primary model vary with changes in environmental or other factors correspond to the secondary level of modeling (McMeekin and Ross, 2002). To develop the secondary models, p and δ values obtained from the fit of Eq. (1) to the survival curves in which at least 1 log_{10} cycles of inactivation was achieved have been used. The relationships between the shape parameter (p value) and pH of the treatment medium for *L. monocytogenes* and *S. aureus* were described by the following equation:

$$p = a + b \cdot e^{-e^{(c \cdot \text{pH} + d)}} \tag{2}$$

where pH is the pH of the treatment medium and a , b , c and d are coefficients which values are respectively 0.408, 0.302, -4.573 and 23.153 for *L. monocytogenes* and -0.959 , 1.267, -1.183 and 1.389 for *S. aureus*. The RMSE, R^2 and accuracy (A_f) factor for each equation indicating the goodness of the fitting are 1.034, 0.992 and 0.034 for *L. monocytogenes* and 1.045, 0.959 and 0.044 for *S. aureus* respectively.

The relationship among the scale parameter (δ value), electric field strength and pH of the treatment medium was described by a multiple regression, considering the decimal logarithm of δ as the dependent variable. In a first approach, the following independent variables of the polynomial regression equation were considered: E, pH, E², pH², E³, pH³, E * pH, E² * pH, E * pH², and E² * pH². Backward stepwise regression was used to eliminate non-significant variables, since these variables or their interactions did not provide any additional useful information to the model. Table 2 shows the coefficients and the F values of each variable used for the polynomial equations to fit the δ values. The F values for equation parameters were used to indicate the significance of the effect of the variables and their interactions (Ng and Schaffner, 1997).

Considering the relationships observed among the p and δ parameters and the field strength and pH for each microorganism indicated in Eq. (2) and in Table 2, and including them in Eq. (1), the following tertiary models were obtained:

Tertiary model for *L. monocytogenes*:

$$\text{Log}_{10} \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{10^{(0.408 + 0.302 e^{-e^{(4.573 \text{pH} + 23.153)}})}} \right)$$

Tertiary model for *S. aureus*:

$$\text{Log}_{10} \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{10^{(-4.33 + 4.86 \text{pH} - 0.48 \text{pH}^2 - 0.15 \text{E} \text{pH} + 0.0014 \text{E}^2 \text{pH} + 0.0092 \text{E} \text{pH}^2)}} \right)^{0.959 + 1.267 e^{-e^{(1.183 \text{pH} + 1.389)}}$$

Table 1

δ and p values from the fitting of the mathematical model based on the Weibull distribution to the survival curves of *Listeria monocytogenes* 5672 and *Staphylococcus aureus* 4459 treated by PEF.

E	pH	<i>Listeria monocytogenes</i> 5672				<i>Staphylococcus aureus</i> 4459			
		p (CL 95%)	δ (CL 95%)	R^2	RMSE	p (CL 95%)	δ (CL 95%)	R^2	RMSE
15	3.5	0.40 (0.11–0.68)	>501	0.97	0.01	0.34 (0.21–0.47)	363.9 (114.0–613.9)	0.96	0.08
	4.5	1.14 (–1.56–3.84)	>501	0.70	0.22	0.35 (0.19–0.51)	>501	0.92	0.26
	5.5	0.30 (–0.03–0.63)	>501	0.70	0.21	0.89 (0.65–1.14)	>501	0.97	0.04
	7.0	0.33 (–0.11–0.76)	>501	0.90	0.12	0.57 (0.46–0.68)	259.8 (41.59–478.1)	0.98	0.08
20	3.5	0.41 (–0.06–0.87)	>501	0.85	0.04	0.36 (0.18–0.55)	17.92 (1.790–34.04)	0.92	0.22
	4.5	0.28 (–0.06–0.62)	>501	0.92	0.05	0.31 (0.25–0.38)	41.94 (28.82–55.07)	0.98	0.10
	5.5	0.53 (0.14–0.91)	>501	0.82	0.02	0.49 (0.18–0.79)	29.21 (1.81–56.61)	0.89	0.32
	7.0	0.59 (0.23–0.95)	>501	0.72	0.04	0.41 (0.19–0.63)	88.03 (12.38–163.7)	0.90	0.25
25	3.5	0.64 (0.17–1.12)	414.9 (204.8–624.9)	0.89	0.13	0.30 (0.11–0.49)	1.354 (0.27–2.44)	0.90	0.24
	4.5	0.39 (0.20–0.49)	>501	0.85	0.08	0.38 (0.20–0.56)	10.94 (1.89–20.0)	0.91	0.22
	5.5	0.85 (0.43–1.25)	>501	0.82	0.05	0.29 (0.10–0.48)	8.67 (3.34–14.01)	0.86	0.26
	7.0	0.54 (0.09–0.99)	>501	0.90	0.05	0.28 (0.07–0.49)	3.53 (1.40–5.67)	0.88	0.33
30	3.5	0.42 (0.34–0.51)	78.98 (57.00–101.0)	0.94	0.10	0.14 (0.09–0.18)	0.29 (0.16–0.42)	0.98	0.24
	4.5	0.39 (0.17–0.61)	265.3 (147.2–383.4)	0.91	0.15	0.23 (0.13–0.32)	1.82 (1.08–2.56)	0.95	0.15
	5.5	0.73 (0.36–1.10)	>501	0.77	0.44	0.24 (0.12–0.36)	2.41 (1.33–3.49)	0.92	0.22
	7.0	0.82 (0.55–1.10)	435.9 (359.1–512.6)	0.89	0.08	0.30 (0.15–0.45)	2.03 (1.01–3.04)	0.91	0.25
35	3.5	0.36 (0.29–0.44)	21.39 (9.95–32.83)	0.93	0.16	0.11 (0.08–0.15)	0.11 (0.05–0.17)	0.99	0.18
	4.5	0.32 (0.21–0.42)	74.05 (36.45–111.6)	0.89	0.33	0.14 (0.05–0.23)	0.93 (0.41–1.46)	0.93	0.19
	5.5	0.60 (0.46–0.74)	139.2 (104.2–174.3)	0.94	0.14	0.21 (0.12–0.31)	1.19 (0.70–1.67)	0.94	0.12
	7.0	0.65 (0.26–1.04)	348.1 (216.4–479.8)	0.98	0.05	0.26 (0.13–0.40)	2.19 (0.93–3.44)	0.91	0.29

E: Electric field strength (kV/cm); p : Shape parameter; δ : Scale parameter (μ s); CL 95%: Confidence limit; R^2 : Determination coefficient; RMSE: Root mean square error.

Plots of the observed and estimated data with the tertiary models are given in Fig. 3A and B for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. The difference between a point of the graph and the line of equivalence is a measure of the accuracy of the corresponding estimation. The RMSE, R^2 , accuracy (A_f) and bias (B_f) factors for each predictions are also indicated in the figures. In general, the tertiary models accurately predicted the PEF inactivation of both Gram positive bacteria.

The tertiary models were used to generate three-dimensional relationships among the \log_{10} of the survival fraction, the electric field strength and the pH of the treatment medium for *L. monocytogenes* (Fig. 4A) and *S. aureus* (Fig. 4B) after PEF treatments of 100 μ s. In both microorganisms, the lethality increased with the field strength and by decreasing the pH of the treatment medium. In the case of *S. aureus* the influence of both parameters was more noticeable. Thus, an increment of the field strength from 15 to 35 kV/cm at pH 3.5, augmented the lethality 1.3 and 3.8 \log_{10} cycles

in *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. At pH 7.0, this increment of lethality was of 0.4 and 2.4 \log_{10} cycles, respectively.

The tertiary models developed have also permitted to compare the PEF resistance at different pH of the microorganisms investigated in this study and that from other bacteria presented in other publications. Thus, Fig. 5 shows the \log_{10} cycles of inactivation after PEF treatments of 100 μ s at distinct field strengths at pH 3.5, 4.5, 5.5 and 7.0 of *L. monocytogenes* STCC 5672 and *S. aureus* SSTC 4459 from this investigation, *L. monocytogenes* STCC 4031 (Gómez et al., 2005a), *E. coli* O157:H7 (Saldaña et al., in press) and *Salmonella* Typhimurium STCC 878 (Saldaña et al., in press). As observed, microbial inactivation increased with the field strength for all bacteria and pH. However, the PEF resistance of each microorganism varied with the pH. *L. monocytogenes* STCC 5672 was the bacteria most PEF resistant at all pH. Hardly 1 \log_{10} cycle was inactivated after 35 kV/cm and 100 μ s. At pH 3.5, 4.5 and 7.0, *E. coli* O157:H7 showed a similar PEF resistance than *L. monocytogenes* STCC 5672. *L. monocytogenes* STCC 4031 becomes more PEF resistance by increasing the pH of the treatment medium up to maximum resistance at pH 7.0 similar to *L. monocytogenes* STCC 5672. *S. aureus* and *Salmonella* Typhimurium were the microorganisms most PEF sensitive at all pH investigated permitting to achieve around 3–4 \log_{10} cycles of inactivation at 35 kV/cm at any pH investigated.

Table 2

F values for significant variables and their interactions for polynomial equations describing the relationship between the \log_{10} of δ and the electric field strength and pH for *Listeria monocytogenes* 5672 and *Staphylococcus aureus* 4459 treated by PEF.

	<i>Listeria monocytogenes</i> 5672		<i>Staphylococcus aureus</i> 4459	
	Coefficient	F value	Coefficient	F value
Intercept	6.94		–4.33	
E	–0.25	130.71	–	
pH	–		4.86	7.58
E^2	–		–	
pH^2	–0.07	75.91	–0.48124	14.69
E^3	–		–	
pH^3	–		–	
E·pH	0.03	36.84	–0.15	254.46
E^2 ·pH	–		0.0014	24.62
E· pH^2	–		0.0092	43.97
E^2 · pH^2	–		–	
RMSE	0.08		0.17	
R^2 -adj	96.78		94.71	
R^2	97.99		96.10	

4. Discussion

The objective of pasteurization is to minimize any possible health hazards arising from pathogenic microorganisms to a level that is not likely to represent a public health risk under normal conditions of distribution and storage. Therefore, for PEF pasteurization, it is necessary to identify pathogenic target microorganisms for each food product to which refer PEF treatments and to define the process criterion to achieve a determine performance criterion (van Schothorst, 1998; Stewart et al., 2002). For PEF pasteurization, the target microorganisms should be the pathogenic bacteria most PEF resistant under a wide range of conditions. As it has been previously indicated, this investigation is a continuation of a previous study which enabled to identify four PEF resistant strains of Gram positive

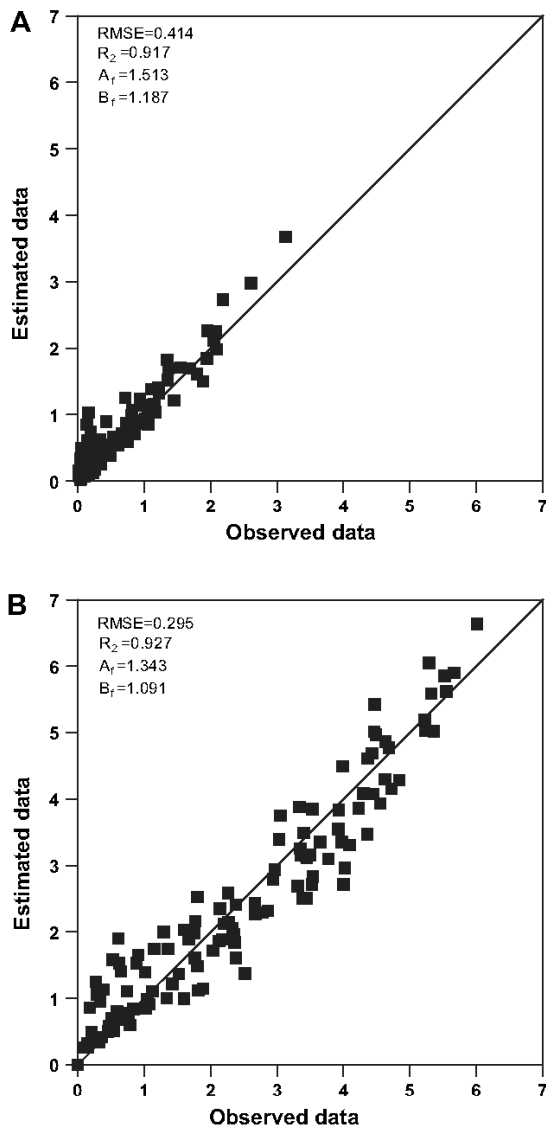


Fig. 3. Correlation between experimental and estimated data obtained with the tertiary models for *L. monocytogenes* STCC 5672 (3A) and *S. aureus* STCC 4459 (3B) treated by pulsed electric fields.

and negative pathogenic bacteria (Saldaña et al., 2009). Since microbial resistance to PEF considerably varies within the pH range of the treatment medium (García et al., 2005a), in this work, it has been systematically investigated for the first time the influence of the pH of the treatment medium in a wide range of field strengths and treatment times in two PEF resistant strains of Gram positive pathogenic bacteria, *L. monocytogenes* STCC 5672 and *S. aureus* STCC 4459. This investigation together with other work done in our lab related to the kinetics of inactivation of two of the most PEF resistant strains of Gram negative pathogenic bacteria in media of different pH (Saldaña et al., in press) will permit to evaluate possible target pathogenic bacteria for PEF pasteurization and to determine the lethal potential of the PEF technology.

In order to establish the treatment conditions for microbial inactivation by PEF, it is necessary to determine the kinetics of

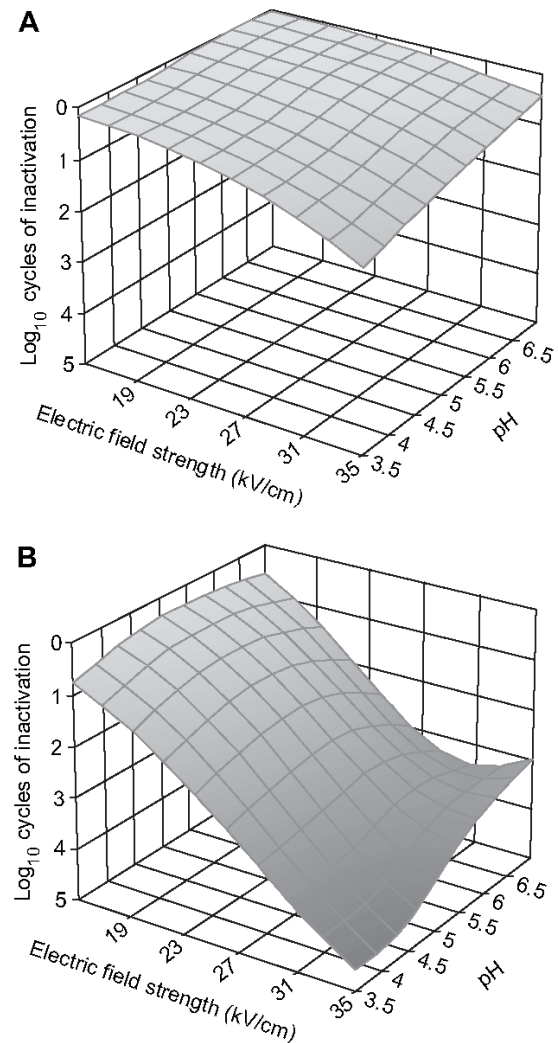


Fig. 4. Three-dimensional views of the influence of the electric field strength and pH on the inactivation of *L. monocytogenes* STCC 5672 (4A) and *S. aureus* STCC 4459 (4B) after PEF treatments of 100 μs .

microbial inactivation and to describe them mathematically. Predictive microbiology is a multidisciplinary area of food microbiology that can provide a way to study the influence of various environmental factors on microbial inactivation or growth and to evaluate their effect quantitatively (McDonal and Sun, 1999). In this investigation, a mathematical equation based on the Weibull distribution has been applied to describe the concave upwards survival curves showed in Figs. 1 and 2. This primary model is gaining popularity due to its simplicity and flexibility. It has been used to model microbial death by different inactivation methods such as heat, high hydrostatic pressures, UV light, ohmic heating, pulsed light, chemicals or pulsed electric fields (Christensen et al., 2001; Mafart et al., 2002; van Boekel, 2002; Álvarez et al. 2003a,c; Rodrigo et al., 2003; Leizeron and Shimoni, 2005; Rivas et al., 2006; Sampedro et al., 2006; Virto et al., 2006; Ahn et al., 2007; Cebrián et al., 2007; Chen, 2007; Hassani et al., 2007; Martín et al., 2007; Pérez et al., 2007; Uesugi et al., 2007; Skandamis et al., 2008; Schenk et al., 2008; Puértolas et al., 2009; Pilavtepe-Çelik et al., 2009). Based on the

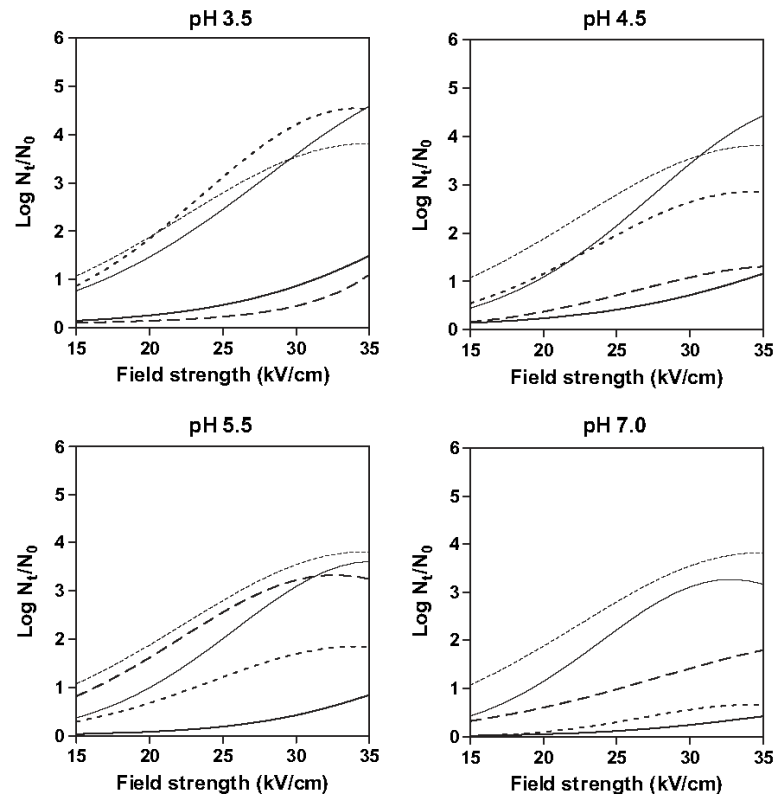


Fig. 5. Log_{10} cycles of microbial inactivation by PEF treatments of 100 μs at different field strengths in media of distinct pH estimated by tertiary models. *L. monocytogenes* 5672 (—●—), *L. monocytogenes* 4031 (—■—), *E. coli* O157:H7 (—▲—), *S. aureus* 4459 (—◆—), *Salmonella* Typhimurium 878 (—★—).

Weibull equation, tertiary models have been developed which adequately described the microbial inactivation of *L. monocytogenes* STCC 5672 and *S. aureus* SSTC 4459 in media of different pH as indicated the RMSE and R^2 showed in Table 1 and the equivalence lines of Fig. 3. The developed tertiary equations have been used to evaluate the influence and interactions of the pH, field strength and treatment time on the inactivation of two of the most PEF resistant Gram positive bacteria. Results showed in Table 2 and in Fig. 4 indicate that the electric field strength (E) for *L. monocytogenes* and its interaction with the pH ($E * \text{pH}$) for *S. aureus* were the most significant parameters (higher F values in Table 2) to be considered. This means that changes in these factors will have a very significant effect on the lethality of both microorganisms and mainly for *L. monocytogenes*. For *S. aureus*, the pH of the treatment media had a significant influence on the PEF resistance and specially it becomes significant with the interaction with the field strength ($E * \text{pH}$, $E^2 * \text{pH}$, $E * \text{pH}^2$). Other authors have also observed that Gram positive bacteria noticeably increased the PEF sensitivity in acidic media including different serotypes of *L. monocytogenes*. This influence of the pH was higher than that determined in this study. Thus, while in this investigation the reduction of the pH from 7.0 to 4.0 increased the lethality of *L. monocytogenes* STCC 5672 and *S. aureus* STCC 4459 0.32 and 0.41 log_{10} cycles, respectively after 100 μs at 25 kV/cm, other authors have observed an increment of 1.7, 2.8 and 2.9 log_{10} cycles of the population of *L. monocytogenes* STCC 5366, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* respectively (Álvarez et al., 2003b; García et al., 2005b; Gómez et al., 2005a; Saldaña et al., 2009) and up to 5 log_{10} cycles of *L. monocytogenes* ATCC 15313 – STCC 4031 when the treatment was at 28 kV/cm (Gómez et al., 2005b). The lower PEF

sensitivity of the strains investigated in this study in acidic media would be due to their higher PEF resistance.

The developed tertiary equations have enabled to compare the PEF resistance in a wide range of treatment conditions of different pathogenic bacteria (Fig. 5). The comparison showed in this Figure has been done at 100 μs since it could be a suitable treatment time to be applied in continuous conditions. This time approximately corresponds to the inflection point in the survival curves (Figs. 1 and 2). This means, that over this point the speed of inactivation decreases, requiring larger PEF treatments, and therefore higher energetic costs, to achieve an equivalence inactivation level. On the other hand, considering the conditions used in this investigation, longer times applied in continuous conditions would increase the temperature of the treatment medium which could result thermally lethal. Based on Fig. 5, the Gram positive microorganism *L. monocytogenes* STCC 5672 has shown a very high PEF resistance at all pH in the investigated range. This would indicate that this strain of *L. monocytogenes* would be a target pathogenic microorganism to be considered to which refer PEF pasteurization treatments independently of the pH of the treatment medium. The PEF resistance of *L. monocytogenes* STCC 5672 showed in Fig. 5 which corresponded to that obtained in buffers, was always higher than that reported in literature for any microorganism independently of the treatment media, pH or PEF treatment (Heinz et al., 2001; Wouters et al., 2001; Álvarez et al., 2006; Mosqueda-Melgar et al., 2008). Only data of *S. aureus* STCC 240 or *L. monocytogenes* ATCC 19115 in milk showed similar PEF inactivation levels (1.0 log_{10} cycles of inactivation) to that observed in this investigation in McIlvaine buffer of the same pH and PEF treatments (Fleischman et al., 2004; Sobrino-López and

Martín-Belloso, 2006). On the other hand, *E. coli* O157:H7 should also be considered as a reference for PEF microbial inactivation in acidic media, moreover when it has been observed that the behavior of Gram negative bacteria in low pH media is different to Gram positive microorganisms (Álvarez et al., 2000; García et al., 2005a,b). It has been generally observed that Gram negative bacteria show lower PEF sensitivity in acidic conditions (Álvarez et al., 2000; García et al., 2005a,b). This higher PEF resistant in acidic media has been attributed to a higher cell-damage recovery capability after PEF treatments in low pH media (García et al., 2003).

In conclusion, the obtained results indicate the scarce lethal effectiveness of PEF technology for these most PEF resistant microorganisms, and mainly for *L. monocytogenes* STCC 5672 at any pH, in the treatment conditions investigated. The highest levels of inactivation achieved of around 1 log₁₀ cycles are quite far away from the 5 log₁₀ reductions proposed for pasteurization of fruit and vegetable juices (Anonymous, 1997). These results point out the need of designing combining processes with PEF which result in additional or synergistic lethal effects mainly in these target microorganisms to increase the lethality of pulsed electric fields. Based on published results (Zhang and Mittal, 2005; Nguyen and Mittal, 2007; Mosqueda-Melgar et al., 2008; Somolinos et al., 2008; Pina-Pérez et al., 2009), the combination of PEF with antimicrobial compounds with activity on these bacteria or the application of PEF treatments at mild temperatures may result on the origin of possible process criterion for PEF pasteurization. Therefore, it is necessary more research to define hurdles with lethal effectiveness by themselves or to increase the lethality of pulsed electric fields to achieve the performance criterion in each food product.

Acknowledgements

G.S. and E.P. gratefully acknowledged the financial support for their doctoral studies from the Department of Science, Technology and University of the Aragon Government and the Spanish Ministry for Science and Innovation. This investigation has been funded by the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ). We gratefully acknowledge Glenn Richardson the review of the English language.

References

- Ahn, J., Balasubramaniam, V.M., Youself, A.E., 2007. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 113 (3), 321–329.
- Álvarez, I., Raso, J., Palop, A., Sala, F.J., 2000. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 143–146.
- Álvarez, I., Manas, P., Condon, S., Sala, F.J., Raso, J., 2003a. Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *J. Food Sci.* 68 (7), 2316–2320.
- Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., Raso, J., 2003b. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 87 (1–2), 87–95.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F.J., Condón, S., 2003c. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiol.* 20, 691–700.
- Álvarez, I., Condón, S., Raso, J., 2006. Microbial inactivation by pulsed electric fields. In: Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications*. Springer, New York, pp. 97–129.
- Anonymous – National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food, 1997. Recommendations for Controlling the Transmission of Pathogenic Microorganisms in Juices. Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- Baird-Parker, T., 2000. *Staphylococcus aureus*. In: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers Inc., Maryland, pp. 1317–1335.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. Validating and comparing predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 159–166.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P., 2005. *Novel Food Processing Technologies*. Boca Raton, Florida.
- 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 (1–2), 139–159.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P., 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 304–311.
- Chen, H.Q., 2007. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food Microbiol.* 24 (3), 197–204.
- Christensen, E.R., Chen, D.X., Nyholm, N., Kusk, K.O., 2001. Joint action of chemicals in algal toxicity tests: influence of response level and dose-response regression model. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (10), 2361–2369.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., Sala, F.J., 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 149–152.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M., 1974. pH and buffers. In: *Data for Biochemical Research*. C. Press, Oxford, pp. 475–508.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 2000. *Listeria monocytogenes*. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc., Maryland, pp. 1178–1216.
- Fleischman, G.J., Ravishankar, S., Balasubramaniam, V.M., 2004. The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiol.* 21 (1), 91–95.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113 (1), 1–15.
- García, D., Gómez, N., Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36 (3), 140–144.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2005a. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Microbiol.* 99, 94–104.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2005b. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6, 388–395.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Condón, S., Raso, J., 2005a. Modeling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 199–206.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Raso, J., Condón, S., 2005b. A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *Int. J. Food Eng.* 70, 7–14.
- Hassani, M., Mañas, P., Pagán, R., Condón, S., 2007. Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs. *Int. J. Food Microbiol.* 116 (2), 228–238.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D., 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 103–111.
- Leizeron, S., Shimoni, E., 2005. Stability and sensory shelf life of orange juice pasteurized by continuous ohmic heating. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4012–4018.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107–113.
- Makino, S.I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, A., Yamamoto, S., Igimi, S., 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 104 (2), 189–196.
- Martin, M.F.S., Sepúlveda, D.R., Altunakar, B., Góngora-Nieto, M.M., Swanson, B.G., Barbosa-Cánovas, G.V., 2007. Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT-Food Sci. Technol.* 40 (7), 1271–1279.
- McDonal, K., Sun, D., 1999. Predictive microbiology for the food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 1–27.
- McMeekin, T.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 133–153.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48 (8), 747–759.
- Ng, T.M., Schaffner, D.W., 1997. Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4), 1237–1243.
- Nguyen, P., Mittal, G.S., 2007. Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chem. Eng. Process* 46, 360–365.
- 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. Technol. Int.* 4, 33–44.
- Pérez, M.C.P., Aliaga, D.R., Saucedo, D., Martínez, A., 2007. Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. *J. Food Prot.* 70, 2281–2289.
- Pilatpepe-Çelik, M., Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F., 2009. Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. *J. Food Eng.* 90 (3), 388–394.
- Pina-Pérez, M.C., Silva-Angulo, A.B., Rodrigo, D., Martínez-López, A., 2009. Synergistic effect of Pulsed Electric Fields and CocooX 12% on the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 130 (3), 196–204.
- Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E., Smid, E.J., 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *J. Food Prot.* 64 (7), 1012–1018.

- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I., 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 130 (1), 49–55.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., Sala, F.J., 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 21–30.
- Raso, J., Heinz, V., 2006. Pulsed electric fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications. New York.
- Rivas, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M., 2006. Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 541–545.
- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M., 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 223–229.
- Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, 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. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10 (2), 160–165.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I., (in press). 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. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.jifset.2010.01.003.
- 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. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 30–34.
- Schenk, M., Guerrero, S., Alzamora, S.M., 2008. Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food Bioprocess Technol.* 1 (4), 384–392.
- van Schothorst, M., 1998. Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures. *Food Control* 9 (6), 379–384.
- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25 (2), 294–303.
- Sobrinho-López, A., Martín-Belloso, O., 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *J. Food Prot.* 69 (2), 345–353.
- Somolinos, M., García, D., Mañas, P., Condón, S., 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 (3), 260–267.
- Stewart, C.M., Tompkin, R.B., Cole, M.B., 2002. Food safety: new concepts for the new millennium. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3 (2), 105–112.
- Uesugi, A.R., Woodling, S.E., Moraru, C.I., 2007. Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *J. Food Prot.* 70, 2518–2525.
- de Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J.C., Martín, P., 2005. Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Euro Surveill.* 10 (10), 251–255.
- Virto, R., Sanz, D., Álvarez, I., Condón, S., Raso, J., 2006. Application of the Weibull model to describe inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by citric and lactic acid at different temperatures. *J. Sci. Food Agric.* 86 (6), 865–870.
- Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V., 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J. Food Prot.* 71 (2), 356–364.
- Wouters, P., Álvarez, I., Raso, J., 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 112–121.
- Zhang, Y., Mittal, G.S., 2005. Inactivation of spoilage microorganisms in mango juice using low energy pulsed electric field in combination with antimicrobials. *Ital. J. Food Sci.* 17 (2), 167–176.

Manuscripto IV



Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions

G. Saldaña^a, E. Puértolas^a, I. Álvarez^a, N. Meneses^b, D. Knorr^b, J. Raso^{a,*}

^a Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet 177, CP 50013 Zaragoza, Spain

^b Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin University of Technology, Koenigin Luise Str. 22, D-14195 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2009

Received in revised form 20 April 2010

Accepted 25 April 2010

Available online 28 April 2010

Keywords:

Pulsed electric fields
Microbial inactivation
Temperature
Numerical simulation

ABSTRACT

A static parallel electrode treatment chamber with tempered electrodes has been designed to obtain kinetics data on microbial inactivation by pulsed electric fields (PEF) at different temperatures at quasi-isothermal conditions. Distribution of the electric field strength and temperature within the treatment zone was estimated by a finite element method. A good agreement was observed between the temperatures estimated by numerical simulation and temperatures measured by a thermocouple in the treatment zone before and after the PEF treatments (values of RMSE below 3%). Influence of the treatment temperature on PEF inactivation (30 kV/cm) of *Salmonella typhimurium* was investigated at temperatures between 4 and 50 °C in media of pH 3.5 and 7.0. Treatment temperature had an important effect on microbial inactivation for both values of pH. At pH 3.5 the inactivation of *S. typhimurium* was irrelevant at 4 °C but about 1.5, 2.9, 4.0 and 5.0 Log₁₀ reductions were obtained after 30 pulses (90 μs) at 15, 27, 38 and 50 °C, respectively. At pH 7.0, around two Log₁₀ cycles of inactivation were observed after 50 pulses (150 μs) at 4 °C. At temperatures in the range between 15 and 50 °C the treatment temperature practically did not influence PEF resistance of *S. typhimurium*. A model based on the Weibull distribution adequately described kinetics of inactivation of *S. typhimurium* at different temperatures. The treatment chamber designed in the investigation could be useful to obtain kinetics data on PEF destruction of microorganisms or other components of interest at a uniform distribution of electric field strength and homogeneous and quasi-isothermal conditions in a wide range of temperatures.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pulsed electric fields (PEF) is an emerging food processing technology with potential for preservation purposes and for improving mass transfer rates in process aims extraction of intracellular components (Raso and Heinz, 2006). Application of PEF at sufficient intensity and duration causes permanent permeabilization of the cytoplasmic membrane of the microbial cells that leads to microbial death (Pagán and Mañas, 2006). The capability of PEF to inactivate microorganisms at temperatures below those used in thermal processing opens very interesting possibilities of using this technology for improving the stability and safety of minimal processed foods.

Inactivation of vegetative cells of bacteria and yeast by PEF has widely been demonstrated (Mosqueda-Melgar et al., 2008). However bacterial spores are resistant to PEF (Pagán et al., 1998; Pol et al., 2001). Therefore applications of PEF will be aimed at

replacing thermal pasteurization as a means of killing vegetative cells. The use of PEF as a pasteurization process requires to demonstrate that during the process all parts of the food receive the required treatment to achieve an inactivation level that not likely to present a public health risk under normal conditions of distribution and storage.

Studies conducted during the last few years have demonstrated that microbial inactivation by PEF depends on the processing factors, properties of the treatment medium and the microbial characteristics (Álvarez et al., 2002). The main process factors determining microbial inactivation level during the PEF treatment are electric field strength, treatment time and treatment temperature (Wouters et al., 2001).

Recently, it has been a considerable progress in the development of continuous flow treatment chambers for PEF processing that are essential for scaling up the technology for industrial applications. Several different designs have been developed through the years for this key component wherein high voltage delivery by the power supply is applied to the food (Huang and Wang, 2009).

* Corresponding author. Tel.: +34 976 76 26 75; fax: +34 976 76 15 90.
E-mail address: jraso@unizar.es (J. Raso).

The most important criterion for a successful design of the treatment chamber in terms of assuring food safety is a uniform treatment of food when passing through the treatment chamber. The uniformity of the treatment in a continuous flow PEF treatment chamber depends not only on electric field distribution but also on temperature profile and flow dynamics during the treatments (van den Bosch, 2007). During the PEF treatment the food is heated as result of the dissipation of electrical energy and, as a consequence, temperature dependent food properties such as electrical conductivity, density, viscosity and thermal conductivity are modified (Fiala et al., 2001). Changes in electrical conductivity may influence electric field distribution and changes in food viscosity, density and thermal conductivity may affect product flow. As a consequence, to achieve experimentally information of the distribution of the electric field strength and temperature in a continuous flow treatment chamber is a difficult task.

Numerical simulation of the fluid dynamics coupled with the distribution of electric field strength and temperature inside the treatment chamber can provide a detailed knowledge of the spatial and temporal distribution of both parameters in the treatment chamber during PEF treatments under various operation conditions (Qin et al., 1995; Góngora-Nieto et al., 2003). Numerical simulation has been proved to be a very useful tool to optimize the treatment chamber geometry for improving the uniformity of the process in order to avoid an over or under-processing of foods (Gerlach et al., 2008; Lindgren et al., 2002; Toepfl et al., 2007; van den Bosch, 2007). However, even after geometrical optimization of the chamber, it has been observed inhomogeneity in electric field strength and temperature distribution (Jaeger et al., 2009).

As numerical simulation can provide a detailed knowledge of the spatial and temporal distribution of the electric field strength and temperature in the treatment chamber, an approach to estimate the microbial inactivation in a continuous PEF treatment is to assume that the inactivation in an inhomogeneous PEF process is a function of the momentary electric field strength and temperature in the different zones of the treatment chamber. In order to validate this assumption, kinetics data on microbial inactivation by PEF at different temperatures and electric field strengths are required. This data should be obtained under homogeneous electric field strength and temperature conditions.

Kinetics of microbial inactivation by PEF has been investigated by many authors. These studies have been conducted in treatment chambers that operate in either batch or continuous flow. In batch treatment chamber the temperature increases during the PEF treatment and studies generally are conducted only at room temperature (Heinz et al., 1999; Álvarez et al., 2003a; Wesierska and Trziazka, 2007). Investigations on the influence of the temperature on kinetics of microbial inactivation by PEF have been performed in continuous flow treatment chambers modifying the inlet temperature of the treatment medium (Heinz et al., 2003; Sepulveda et al., 2005; Amilai et al., 2007). The main problem of continuous treatment chambers to obtain kinetics data is the inhomogeneous distribution of the electric field, temperature and product flow.

The purpose of this investigation is to present and evaluate a design of a treatment chamber that permits obtaining kinetics data on microbial inactivation by PEF at different temperatures under a uniform electric field strength distribution and quasi-isothermal conditions. The performance of this treatment chamber for microbial inactivation has been evaluated studying the influence of the temperature of treatment medium on the inactivation of *Salmonella typhimurium* by a PEF treatment at 30 kV/cm in media of different pH.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

The strain of *S. typhimurium* 878 used in this investigation was supplied by the Spanish Type Culture Collection. During this investigation the culture was maintained on slants of Tryptic Soy Agar (Biolife, Milan, Italy) with 0.6% Yeast Extract added (Biolife) (TSAYE).

A broth subculture was prepared by inoculating a test tube containing 5 mL of Tryptic Soy Broth (Biolife) with 0.6% Yeast Extract (TSBYE) with a single colony, followed by incubation at 37 °C for 24 h. With this subculture, a flask containing 50 mL of sterile TSBYE was inoculated to a final concentration of approximately 106 cells/mL. The culture was incubated under agitation at 37 °C until the stationary growth phase was reached (24 h).

2.2. PEF unit

PEF equipment used in this investigation was supplied by ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden). The apparatus generates square waveform pulses of a width of 3 μ s with a frequency up to 300 Hz. The maximum output voltage and current were 30 kV and 200 A, respectively. The equipment consists of a direct current power supply which converts the 3-phase line voltage to a regulated DC voltage. It charges up six IGBT switching modules (high-power solid-state switches) to a primary voltage around 1000 V. An external trigger pulse gates all the modules and controls its discharge to a primary pulsed signal of around 1000 V. Finally, a pulse transformer converts this primary 1000 V pulse to a high voltage pulse of desired high voltage.

The batch parallel electrode treatment chamber used in this investigation is based on a previous design of Heinz et al. (1999). Treatment chamber consists of a cylindrical polypropylene tube closed with two polished stainless steel cylinders of 2.01 cm² surface and 4 cm length. The inner part of the electrodes was empty and dielectric oil (conductivity: 1.4 μ S/cm) tempered at different temperatures was recirculated through both electrodes to temper the treatment medium at different temperatures and to maintain a constant temperature in the medium during the PEF treatments (Fig. 1). A small hole in the cylindrical plastic tube was used to introduce and remove the microbial suspension. Distance between electrodes was 0.25 cm.

Actual voltage and current intensity applied were measured with a high voltage probe (Tektronix, P6015A, Wilsonville, Oregon, USA) and a current probe, respectively (Stangenes Industries Inc. Palo Alto, California, USA) connected to an oscilloscope (Tektronix, TDS 220, Wilsonville, Oregon, USA).

2.3. Temperature measurement

Before applying the PEF treatment, in order to know the temperature in different zones of the treatment chamber and to perform an experimental validation of the temperature distribution obtained by the finite element simulation, the temperature was measured in the treatment chamber using a thermocouple K (Ahlborn, Holzkirchen, DE) of 0.5 mm diameter with a $T_{90} = 1.2$ s.

Homogeneity of the electric field strength can be affected by the presence of a temperature probe inside the treatment chamber. Therefore, the temperature was measured after the PEF in the geometrical centre of the treatment zone with the same thermocouple activated pneumatically as it was previously described (Raso et al., 2000).

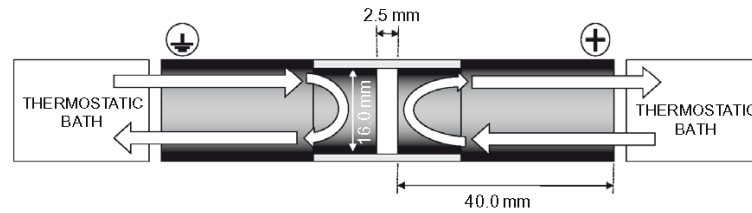


Fig. 1. Scheme of the parallel electrode treatment chamber used in this investigation.

2.4. Numerical simulation of electric field strength and temperature in the treatment chamber

The distribution of the electric field strength and temperature in the treatment zone of the chamber was numerically simulated by the finite element method, using the Comsol Multiphysics Software (Comsol Inc., Stockholm, Sweden).

The governing equations for the thermo-electric phenomena in a batch system are adapted from Comsol Multiphysics and are based on the charge conservation and a heat transfer balance in a liquid.

The equations to solve the electrical potential are based on charge conservation:

$$-\nabla \cdot (\sigma \nabla V - j^e) = 0 \tag{1}$$

where σ is the electrical conductivity ($S m^{-1}$), V is the electrical potential (V) and j^e ($A m^{-2}$) is the externally generated current density.

The energy balance for a pure conductive heat transfer in a liquid energy balance is;

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \nabla \cdot (-k \cdot \nabla T) = Q \tag{2}$$

where C_p denotes the specific heat capacity ($m^2 s^{-2} K^{-1}$), T is temperature (K), k is the thermal conductivity ($kg m s^{-3} K^{-1}$), ρ is the density ($kg m^{-3}$), t is the time (s) and Q is a sink or source term ($kg m^{-1} s^{-3}$). In this case, Q is related to the electrical energy due to ohmic heating effects:

$$Q = \sigma |E|^2 \tag{3}$$

where E is the electric field strength ($kV cm^{-1}$).

Boundary conditions for Eq. (1) were set up as zero potential for the grounded electrode, electrical insulation for the plastic insulator and the high voltage electrode was set up based on a rectangular function as a function of the time, the initial voltage V and a pulse width of 3 μs .

For the solution of Eq. (2), the electrically insulation side walls of the treatment chamber were set up as thermal insulated, whereas the electrode walls were set up as thermal conductive and it was assumed a heat exchanging between the sample and the tempering media according to Eq. (4).

$$n \cdot (k \nabla T) = h \cdot (T_{media} - T) \tag{4}$$

where T_{media} is the circulating oil and h is the heat transfer coefficient ($W m^{-2} K^{-1}$).

The heat transfer coefficient was calculated assuming a vertical flow direction against the electrode walls and was based on the Reynolds and Prandtl number for a laminar forced convection according to Eq. (5).

$$h = \left(\frac{k}{L}\right) \cdot 0.664 \cdot Re^{0.5} \cdot Pr^{0.343} \tag{5}$$

where L is the diameter of the electrode (m), Reynolds number (Re), Prandtl number (Pr), velocity and thermophysical properties of the circulating oil are summarized in Table 1.

Simulation was performed as unsteady-state and all of the thermophysical properties of the treated sample were set up depending on temperature based on water properties.

The electrical conductivity was determined experimentally according to Eq. (6).

$$\sigma = 5 \times 10^{-4} \cdot T + 0.0875 \tag{6}$$

The geometric domain for simulations of initial temperature (before PEF treatments) were without considering the wall thickness of the treatment chamber, since a equilibrium state and constant temperature between the walls and the circulating oil were assumed. The wall thickness becomes important when a transient simulation of PEF is performed, since the heat transfer between walls and circulating oil is changing during each pulse.

2.5. Microbial inactivation experiments

Experimental conditions to investigate the influence of temperature on microbial inactivation by PEF were: pulse frequency of 0.5 Hz, pulse width of 3 μs , electric field strength 30 kV/cm, treatment time up to 150 μs and temperatures of 4, 15, 28, 38 and 50 °C.

Before treatments, microorganisms were centrifuged at 6000g for 5 min and resuspended in citrate-phosphate McIlvaine buffer of pH 7.0 and 3.5 (Dawson et al., 1974) which concentration was adjusted to an electrical conductivity of $0.1 \pm 0.01 S/m$. The microbial suspension (0.5 ml) at a concentration of 10^8 CFU/mL was placed in the treatment chamber with a sterile syringe.

After treatments, appropriate serial dilutions were prepared in sterile 0.1% peptone water and plated onto TSAYE. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and afterwards colonies were counted with an improved image analyser automatic counter (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK) as previously described (Condón et al., 1996). Survival curves were based on mean values obtained from two independent experiments.

2.6. Modelling microbial inactivation

A mathematical model based on the Weibull distribution was used to fit the survival curves:

$$\log_{10} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^\rho \tag{7}$$

Table 1
Thermophysical properties of the circulating oil.

Thermal conductivity ($W m^{-1} K^{-1}$)	0.2
Density ($kg m^{-3}$)	920
Viscosity (Pa s)	0.035
Heat capacity ($J kg^{-1} K^{-1}$)	2000
Circulating velocity ($m s^{-1}$)	0.26
Reynolds number ($Re = \frac{\rho v L}{\eta}$)	107
Prandtl number ($Pr = \frac{\rho c_p \eta}{k}$)	350
Heat transfer coefficient ($W m^{-2} K^{-1}$)	651

where N_t is the number of microorganisms that have survived after the treatment, N_0 is the initial number of the microbial population, t is the treatment time, and δ and ρ are the scale and shape parameters, respectively. The δ value represents the time necessary to inactivate the first Log_{10} cycle of the microbial population. The ρ value accounts for upward concavity of a survival curve ($\rho < 1$), a linear survival curve ($\rho = 1$), and downward concavity ($\rho > 1$) (Mafart et al., 2002).

To determine the δ and ρ values, the GraphPad PRISM® (Graph Software, San Diego, CA, USA) was used.

3. Results and discussion

Electric field strength, treatment time and treatment temperature are critical parameters to define a PEF treatment. Obtaining suitable kinetics data on microbial inactivation requires an accurate definition of the treatment conditions and homogeneous treatment conditions. The uniformity of the treatment is highly dependent of the treatment chamber design. Fig. 2 shows the electric field distribution within the treatment zone of the chamber obtained by numerical simulation. It is observed that the electric field strength distribution inside the treatment region was uniform.

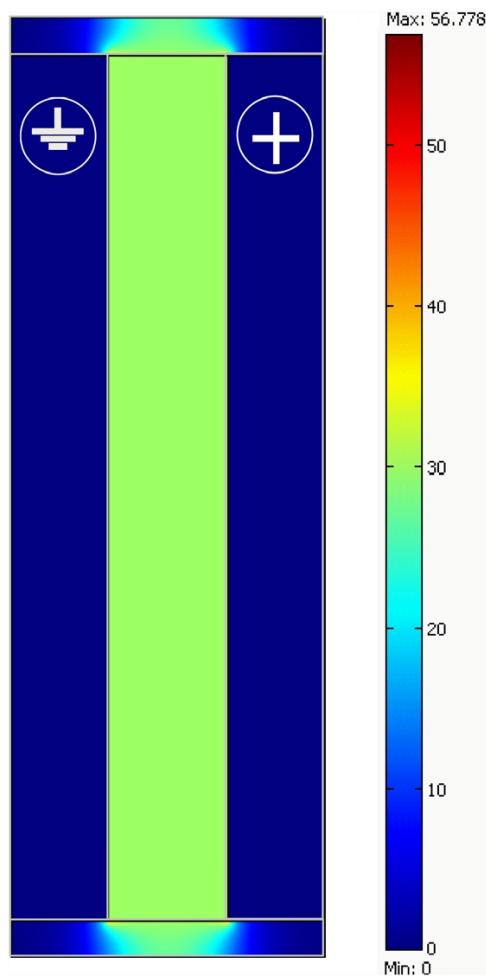


Fig. 2. Numerical simulation of electric field strength in the treatment zone of the parallel electrode treatment chamber. Selected voltage for calculation was 7.5 kV.

Only it was detected intensity peaks in a small zone that corresponded to the interfaces between electrodes and insulation. As it has been reported by other authors, among the different treatment chamber geometries (parallel plate, co-axial, co-linear) the parallel plate configuration is that which produces the highest level of field uniformity (Jaeger et al., 2009). Heterogeneity of the electric field distribution is probably the most important methodological artefact on the estimation of the microbial resistance to PEF. Local electric field strength variations in the treatment region should be avoided since they could cause under or over-processing of the microbial population and affect the estimation of the PEF microbial resistance.

Fig. 3 illustrates the temperature distribution in the treatment region as obtained by numerical simulation tempering the electrodes at temperatures between 4 and 50 °C before applying a PEF treatment. As it is shown in this figure, a comparison of the temperature estimated by the simulation and the measured temperature by a thermocouple at different locations of the treatment region showed conformity between estimated and measured values. These results indicate that the small size of the temperature probe in comparison of the treatment chamber dimension did not cause important modifications of the experimental temperature measurement. According to these observations the treatment chamber with tempered electrodes permits to study the microbial inactivation by PEF at different temperatures.

Although the duration of the pulses applied during the PEF treatments are in the range of microseconds, the pulse energy required to generate the high electric fields necessary to induce microbial inactivation causes a significant temperature increase due to ohmic heating. Fig. 4 compares the evolution of the temperature measured with a thermocouple in the geometrical centre of the treatment chamber with and without tempered electrodes after the application of PEF treatments of different duration. A remarkable difference was observed in the temperature evolution in both treatment chambers. After the application of 50 pulses of 3 μs the temperature increased 6.5 °C in the treatment chamber without tempered electrodes and only 3.8 °C in the treatment chamber with the tempered electrodes. Therefore the circulation of the dielectric oil through permits to apply PEF treatments at different temperatures and to minimise the increment of the medium temperature during the PEF treatment.

For an efficient and reliable characterisation of a PEF treatment it is interesting to know the spatial temperature distribution in the treatment region. Numerical simulation is a useful tool to know this temperature distribution because the introduction of a measuring device in an electric field environment can lead to signal perturbation and interferences with the electric field. As an example, Fig. 5 shows a mapping of temperature distribution in the treatment zone after a PEF treatment of 30 kV/cm for 50 pulses of 3 μs performed by numerical simulations when the initial temperature was 28 °C. The treatment medium was heated through the ohmic energy dissipation that is proportional to the square of the electric field intensity. Although the electric field distribution in the treatment region was uniform it was observed an inhomogeneous temperature distribution as consequence of the heat conduction towards the interface between the treatment medium, the electrode and the insulator. The maximum temperature increase was reached at the geometrical centre of the treatment chamber that corresponded with the farthest location from the surface of the tempered electrodes and insulators. Under the PEF treatment condition investigated (30 kV/cm for 50 pulses of 3 μs) a temperature increment from 28 to 32 °C was estimated in the geometrical centre of the treatment zone.

Validation of the temperature estimated by numerical simulation was performed by temperature measurements in the geometrical centre of the treatment region with a thermocouple. Fig. 6

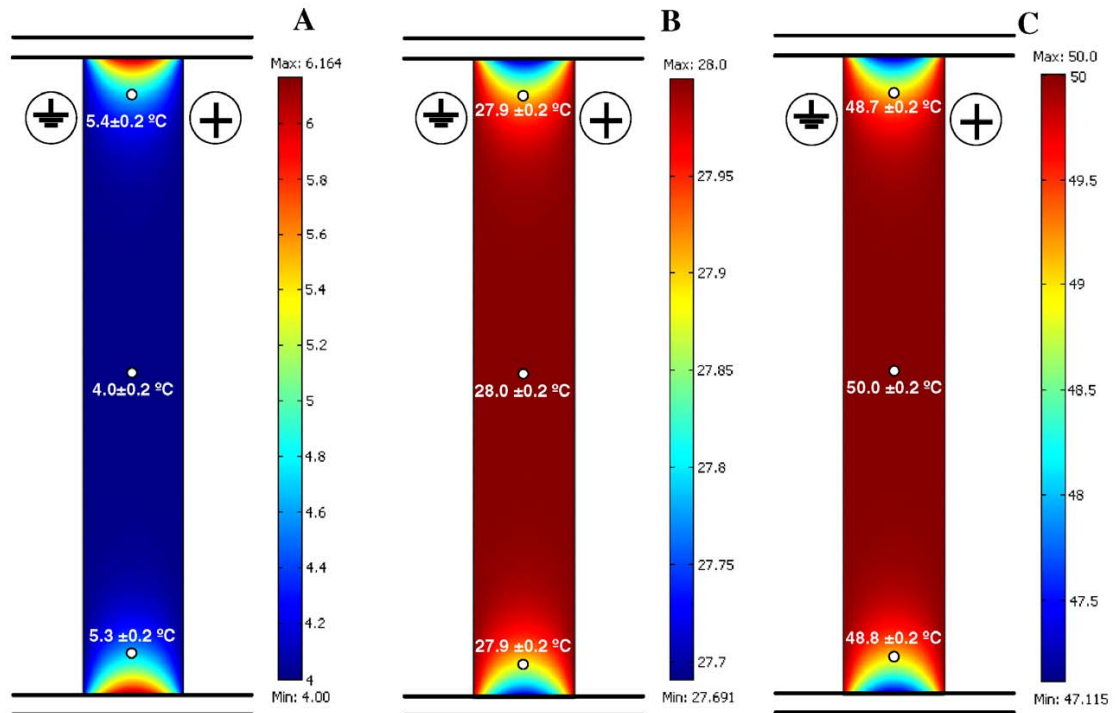


Fig. 3. Numerical simulation of the temperature in the treatment zone of the parallel electrode treatment chamber when the electrodes were tempered at different temperatures (A = 4 °C, B = 28 °C, and C = 50 °C). Temperatures shown in the treatment zone correspond with the values measured with a thermocouple in different locations of the treatment chamber.

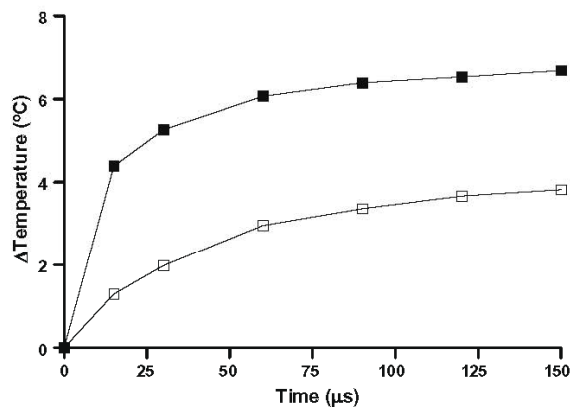


Fig. 4. Comparison of the evolution of the measured temperature in the geometrical centre of the treatment zone in the treatment chamber without tempered electrodes (■) and with tempered electrodes (□) during a PEF treatment (30 kV/cm, 0.5 Hz, square wave pulses of 3 μs).

shows a good conformity between the estimated and the measured values after applying PEF treatments of different duration at different electric field strengths (values of RMSE below 3%). Therefore the temperature measurement in the geometrical centre of the treatment chamber just after the PEF treatment is a good procedure to estimate the temperature reached in the treatment zone during the PEF treatment.

Fig. 7 shows the evolution of the temperature measured with a thermocouple in the geometrical centre of the treatment chamber during the application of a PEF treatment at 30 kV/cm at different

initial temperatures. According to this figure, with the new chamber design with an active tempering system it is possible to apply PEF treatments at different temperatures. The temperature increment during a PEF treatment was always lower than 4 °C even after a treatment of 50 pulses of 3 μs at 30 kV/cm.

In order to evaluate the performance of the treatment chamber for obtaining kinetics data at different temperatures and quasi-isothermal PEF inactivation of *S. typhimurium* was investigated. Fig. 8 shows survival curves corresponding to the inactivation of *S. typhimurium* by a PEF treatment at 30 kV/cm at temperatures between 4 and 50 °C in media of pH 3.5 (Fig. 8A) and 7.0 (Fig. 8B). Treatment temperature had an important effect on microbial inactivation depending on the pH of the treatment medium. At pH 3.5 the inactivation of *S. typhimurium* was irrelevant at 4 °C but at higher temperatures, inactivation increased by increasing the temperature. For example about 1.5, 2.9, 4.0 and 5.0 Log₁₀ reductions were obtained after 30 pulses (90 μs) of 30 kV/cm at 15, 27, 38 and 50 °C, respectively. At pH 7.0, sensitivity of *S. typhimurium* to PEF at 4 °C was greater than at pH 3.5. At this low temperature, in the medium of neutral pH around two Log₁₀ cycles of inactivation was observed after 50 pulses (150 μs). At temperatures in the range between 15 and 50 °C, the treatment temperature practically did not influenced PEF resistance of *S. typhimurium* after 10 pulses (30 μs) or higher. For example, after 30 pulses (90 μs) of 30 kV/cm inactivation at 15, 27, 38 and 50 °C was around four Log₁₀ reductions.

The influence of the temperature on bacterial inactivation by PEF has been investigated in different studies and generally it has been reported an improvement in microbial inactivation at higher temperatures (Heinz et al., 2003; Sepulveda et al., 2005; Amilai et al., 2007). However, these investigations have been generally conducted in continuous flow processes in which both the

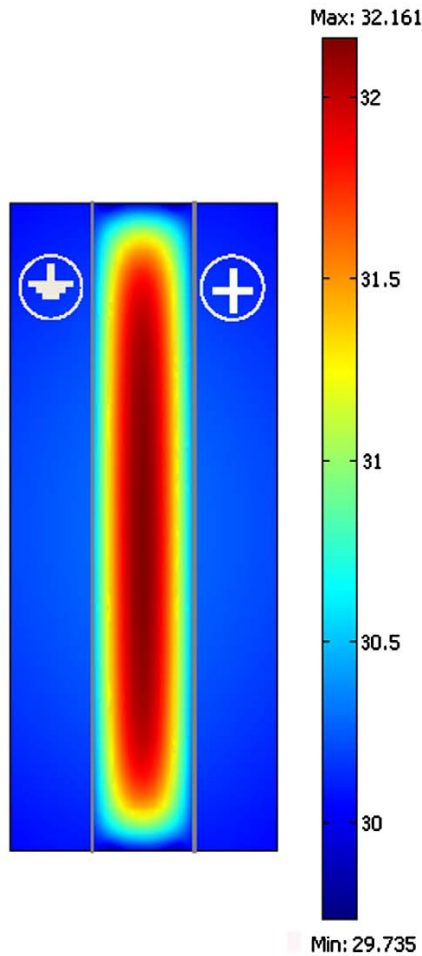


Fig. 5. Surface plot of the temperature in the treatment chamber after the application of 50 pulses of 3 μ s at 30 kV/cm and an initial temperature of 28 $^{\circ}$ C.

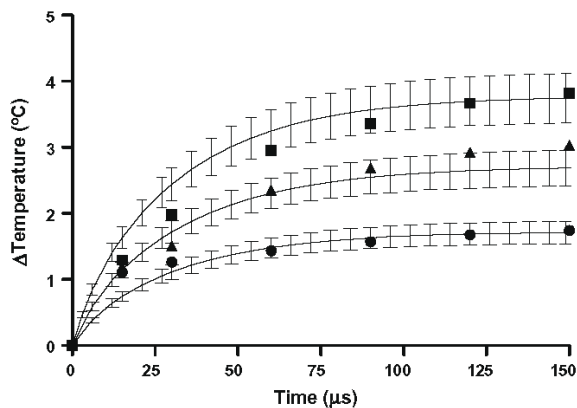


Fig. 6. Comparison of temperature estimated by numerical simulation and temperature measured by a thermocouple in the geometrical centre of the treatment zone during different PEF treatments at 28 $^{\circ}$ C as initial temperature: (■) 30 kV/cm, 0.5 Hz, square wave pulses of 3 μ s (▲); 25 kV/cm, 0.5 Hz, square wave pulses of 3 μ s, (●); 20 kV/cm, 0.5 Hz, square wave pulses of 3 μ s. Errors bars correspond to standard deviation.

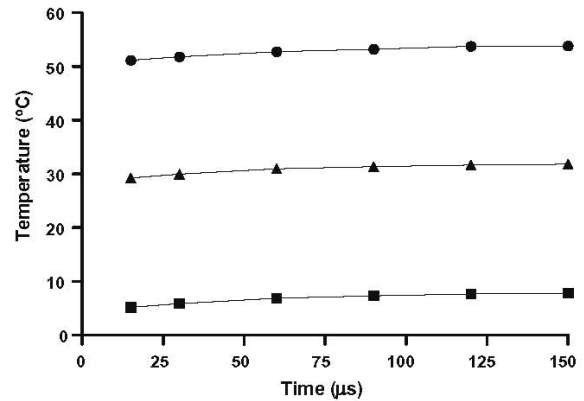


Fig. 7. Increment of the temperature in geometrical centre of the treatment zone when the treatment zone was tempered at different temperatures (■) 4 $^{\circ}$ C, (▲) 28 $^{\circ}$ C, (●) 50 $^{\circ}$ C during a PEF treatment (30 kV/cm, 0.5 Hz, square wave pulses of 3 μ s).

temperature and the electric field strength are not uniform and the experiments are conducted at temperatures below room temperature. In these experiments, the reported temperature to characterize the treatment corresponded with the inlet or outlet temperature but not with the temperature inside the treatment chamber. Jaeger et al. (2009) demonstrated that the temperature occurring within the PEF treatment chamber differs considerably with the measured outlet temperature. Using the treatment chamber designed in this investigation, the influence of the temperature on inactivation of *S. typhimurium* by PEF has been investigated in a wide range from 4 to 50 $^{\circ}$ C using numerical simulations to assist the treatment chamber design.

The effect of the temperature on microbial PEF resistance has been related to the influence of the temperature on the phase transition of cytoplasmatic membrane phospholipids from gel to liquid-crystalline structure, which affects the stability of the cell membrane (Jayaram et al., 1993). As our results indicate that the influence of the temperature on the microbial inactivation depends on pH of the treatment medium, therefore or phase transition of phospholipids is influenced by the pH in which the microorganisms are suspended or other mechanisms different from phase transition are involved in the microbial sensitivity to PEF at higher temperatures.

Fig. 8 shows that the inactivation kinetics of *S. typhimurium* was non-linear when the Log_{10} of the survival fraction was plotted against the treatment time, independently of the pH and treatment temperature. Although some authors have found a linear relationship between the Log_{10} of survivors and treatment time at constant electric field strength, in general these linear relationship has been observed in studies where the duration of the treatment was very short and the inactivation was not extended more than four Log_{10} cycles (Martín-Belloso et al., 1997; Sensoy et al., 1997; Reina et al., 1998). If the treatment time was prolonged generally concave upward survival curves similar to those obtained in this investigation were observed (Ohshima et al., 2002; Puértolas et al., 2009; Rodrigo et al., 2003). Therefore our results indicate that the modification of the treatment temperature does not modify the shape of the survival curves corresponding to the inactivation of *S. typhimurium* by PEF. A variability of resistances within the microbial population or the existence of two subpopulations that could be innate to the population or caused by an adaptation of the microorganism to the treatment could be the origin of this survival curve shape (Álvarez et al., 2003b).

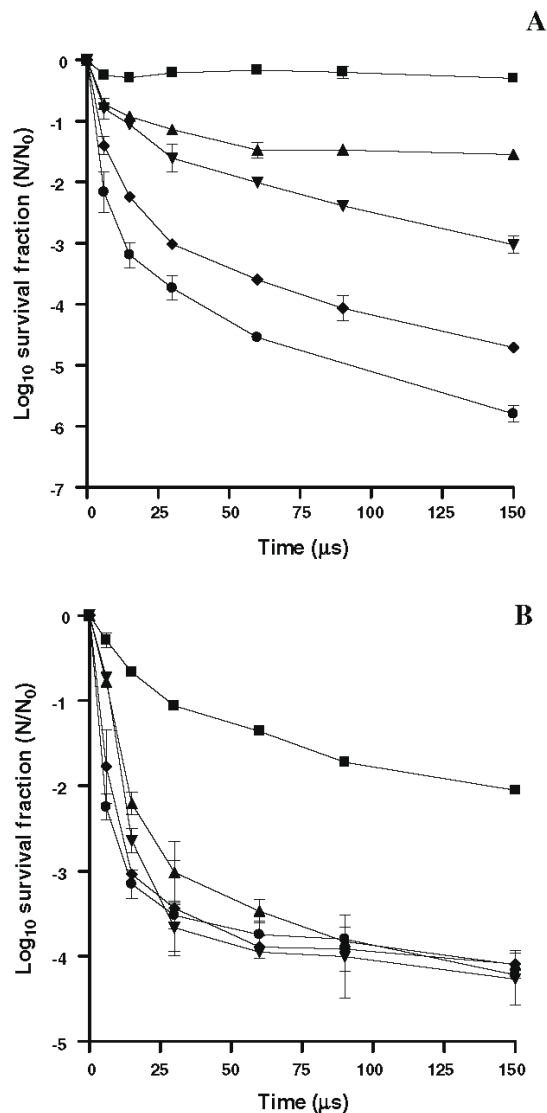


Fig. 8. Survival curves corresponding to the inactivation of *Salmonella typhimurium* by a PEF treatment (30 kV/cm, 0.5 Hz, square wave pulses of 3 μs) at different temperatures (4 °C (■), 15 °C (▲), 28 °C (▼), 38 °C (◆) and 50 °C (●)) in media of pH 3.5 (A) and 7.0 (B). Errors bars correspond to standard deviation.

Between the several approaches that have been proposed to model concave upward survival curves corresponding to microbial inactivation by PEF, the model based on the Weibull distribution has been used by different authors (Álvarez et al., 2003a,b; Rodrigo et al., 2003; Rodríguez-Calleja et al., 2006; Cebrián et al., 2007). Table 2 shows the parameters of the Weibull model obtained by fitting the equation proposed by Mafart et al. (2002) to the survival curves obtained in this investigation. The root mean square error (RMSE) and the determination coefficient (R^2) of the fits show that the model was effective in predicting PEF inactivation of *S. typhimurium* at different treatment temperatures. It is observed that the influence of the temperature on the estimated parameters of the Weibull model depended on the pH of the treatment medium. At pH 3.5, the shape parameter (ρ) was independent of treatment temperatures and no significant differences ($p > 0.05$) were found between the ρ values obtained at different temperatures.

Table 2

δ and ρ values from the fitting of the model based on the Weibull distribution to the survival curves corresponding to the inactivation of *Salmonella typhimurium* by a PEF treatment (30 kV/cm) at different temperatures in media of pH 7.0 and 4.0.

pH	Temperature (°C)	δ Value (CL 95%)	ρ Value (CL 95%)	R^2	RMSE
3.5	4	nd	nd	nd	nd
	15	16.95 ± 6.33	0.22 ± 0.05	0.97	0.09
	27	11.26 ± 2.46	0.42 ± 0.04	0.99	0.11
	38	1.57 ± 0.77	0.34 ± 0.04	0.99	0.16
	50	0.29 ± 0.18	0.28 ± 0.03	0.99	0.18
7.0	4	32.53 ± 4.58	0.49 ± 0.12	0.99	0.08
	15	1.08 ± 1.96	0.33 ± 0.11	0.93	0.40
	27	0.85 ± 1.67	0.30 ± 0.09	0.94	0.62
	38	0.091 ± 0.26	0.20 ± 0.08	0.94	0.39
	50	0.017 ± 0.036	0.16 ± 0.03	0.98	0.21

CL 95%: confidence limit. R^2 : determination coefficient. RMSE: root mean square error.

nd: Not determined.

When no significant differences are observed between the p values it is possible to estimate a single ρ value determining the mean value of the shape parameter obtained under different experimental conditions. A constant shape parameter means that the Weibull probability density function curves present the same shape for all conditions investigated (Couvert et al., 2005). When the scale parameter was re-estimated considering for all survival curves the mean value of the shape parameter ($\rho = 0.31$) the following linear relationship between the log of the δ value and the temperature (°C) was observed:

$$\text{Log}_{10} \delta = -0.049T + 2.11 \quad (R^2 = 0.98) \quad (8)$$

For the survival curves obtained in a medium of pH 7.0, it was observed that both the shape parameter and the scale parameter were dependent of temperature. A linear relationship and an exponential relationship were observed between the temperature (°C) and the shape and scale parameters, respectively:

$$\rho = -0.007T + 0.48 \quad (R^2 = 0.94) \quad (9)$$

$$\text{Log}_{10} \delta = -0.068T + 1.60 \quad (R^2 = 0.97) \quad (10)$$

The scale parameter (δ) in the Weibull model modified by Mafart et al. (2002) represents a characteristic time at which the survival function $\text{Log}_{10}S(t) = -1$. At pH 7.0, the lower values of this parameter observed at higher temperatures indicates that at the first moments of the treatment the inactivation is faster. However, if the treatment time is prolonged to get more inactivation the effect of the temperature disappears. Fig. 8B shows that temperature did not influenced microbial inactivation by PEF between 15 and 50 °C at treatment times longer than 60 μs.

As conclusion, it has been demonstrated that the designed treatment chamber with tempered electrodes permits to apply uniform electric field strengths at different temperatures and at quasi-isothermal conditions. Inactivation of *S. typhimurium* by PEF was function of treatment time, treatment temperature and pH of the treatment medium. The temperature effect on the microbial inactivation depended on the pH of the treatment medium. A model based on the Weibull distribution adequately described kinetics of inactivation of *S. typhimurium* at different temperatures. Generally by increasing the treatment temperature, the number of pulses required to obtain a given level of inactivation was reduced. This investigation shows the necessity of obtaining kinetics data on microbial inactivation by PEF at different temperatures and electric field strengths since the kinetic parameters are highly depended on the temperature of the treatment medium.

Acknowledgements

G.S. and E.P. gratefully acknowledged the financial support for their doctoral studies from the “Ministerio de Ciencia e Innovación”. This investigation has been funded by the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ) and the CICYT (Project AGL 2007-62738). We gratefully acknowledge Glenn Richardson the review of the English language.

References

- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F.J., Condón, S., 2002. Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology* 35, 489–493.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F.J., Condón, S., 2003a. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology* 20, 691–700.
- Álvarez, I., Virto, R., Raso, J., Condón, S., 2003b. Comparing predicting models for *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 195–202.
- Amlal, M., Ngadi, M.O., Smith, J.P., Raghavan, G.S.V., 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering* 79, 689–694.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P., 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology* 118, 304–311.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., Sala, F.J., 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 22, 149–152.
- Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N., Mafart, P., Leguérinel, I., 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology* 101, 73–81.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M., 1974. *Data for Biochemical Research*. Oxford and Clarendon Press, Oxford, UK.
- Fiala, A., Wouters, P.C., van den Bosch, E., Creighton, Y.L.M., 2001. Coupled electrical-fluid model of pulsed electric field treatments in a model food system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2, 229–238.
- Gerlach, D., Alleborn, N., Baars, A., Delgado, A., Morits, J., Knorr, D., 2008. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 408–417.
- Góngora-Nieto, M.M., Pedrow, P.D., Swanson, B.G., Barbosa-Cánovas, G.V., 2003. Impact of air bubbles in a dielectric liquid when subject to high field strengths. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 57–67.
- Heinz, V., Phillips, S.T., Zenker, M., Knorr, D., 1999. Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. *Food Biotechnology* 13, 155–168.
- Heinz, V., Toepfl, S., Knorr, D., 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 165–175.
- Huang, K., Wang, J., 2009. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: a review. *Journal of Food Engineering* 95, 227–239.
- Jaeger, H., Meneses, N., Knorr, D., 2009. Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 470–480.
- Jayaram, S., Castle, G.S.P., Margaritidis, A., 1993. The effect of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *L. brevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 117–122.
- Lindgren, M., Aronsson, K., Galt, S., Ohlsson, T., 2002. Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 233–245.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107–113.
- Martin-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 1997. Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Engineering* 20, 317–336.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martinez, P., Raybaudi-Massilia, R.M., Martin-Belloso, O., 2008. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13, 747–759.
- Ohshima, T., Akuyama, K., Sato, M., 2002. Effect of culture temperature on high-voltage pulsed sterilization of *Escherichia coli*. *Journal of Electrostatics* 55, 227–235.
- Pagán, R., Mañas, P., 2006. Fundamental aspects of microbial membrane electroporation. In: Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications*. Springer, New York, pp. 73–94.
- 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 Science and Technology International* 4, 33–44.
- Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E., Smid, E.J., 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection* 64, 1012–1018.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I., 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 130, 49–55.
- Qin, B., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Pedrow, P.D., 1995. Pulsed electric field treatment chamber design for liquid food pasteurization using a finite element method. *Transaction of the ASAE* 38, 557–565.
- Raso, J., Heinz, V., 2006. *Pulsed Electric Fields for the Food Industry: Fundamentals and Applications*. Springer, New York.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., Sala, F.J., 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 21–30.
- Reina, L.D., Jin, Z.T., Zhang, Q.H., Yousef, A.E., 1998. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 61, 1203–1206.
- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M., 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 81, 223–229.
- Rodríguez-Calleja, J.M., Cebrián, C., Condón, S., Mañas, P., 2006. Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1054–1062.
- Sensory, I., Zhang, Q.H., Sastry, S.K., 1997. Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field. *Journal of Food Process and Engineering* 20, 367–381.
- Sepulveda, D.R., Góngora-Nieto, M.M., San-Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 38, 167–172.
- Toepfl, S., Heinz, V., Knorr, D., 2007. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing* 46, 537–546.
- van den Bosch, H.F.M., 2007. Chamber design and process conditions for pulsed electric field treatment of food. In: Lelieveld, H.L.M., Notermans, S., de Haan, S.W.H. (Eds.), *Food Preservation by Pulsed Electric Fields*. From Research to Application. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 70–93.
- Wesierska, E., Trziazka, T., 2007. Evaluation of the use of pulsed electrical field as a factor with antimicrobial activity. *Journal of Food Engineering* 78, 1320–1325.
- Wouters, P., Álvarez, I., Raso, J., 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Science and Technology* 12, 112–121.

Manuscrito V

Combined Effect of Temperature, pH, and Presence of Nisin on Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by Pulsed Electric Fields

Guillermo Saldaña,¹ Hugo Minor-Pérez,² Javier Raso,¹ and Ignacio Álvarez^{1*}

Abstract

The combined effect of pH (3.5–7.0), temperature (4°C–50°C), and the presence of nisin (0–200 µg/mL) on the inactivation caused by pulsed electric fields (PEF) in two PEF-resistant Gram-positive microorganisms, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, was investigated. A response surface model using a central composite design was developed for the purpose of understanding the individual effects and interactions of these factors and to identify the most promising combinations for microbial inactivation. According to the developed models, temperature was the factor showing the greatest influence on PEF inactivation in the two strains investigated. A temperature increment from 4°C to 50°C increased the lethality of PEF by 2 and 3 log₁₀ cycles in *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. PEF inactivation in both microorganisms decreased with increased pH in the treatment medium from 3.5 to 7. The effect of the presence of nisin on the increment of PEF lethality for *L. monocytogenes* was additive or slightly synergistic. For *S. aureus*, this effect was synergistic at low temperatures and tended to disappear with increasing temperature. An inactivation of 4.5 and 5.5 log₁₀ cycles was achieved in the populations of *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively, in a medium of pH 3.5 in the presence of 200 µg/mL of nisin at 50°C. Therefore, the application of PEF at moderate temperatures in the presence of antimicrobials such as nisin has great potential for achieving effective control of the vegetative forms of the two PEF-resistant Gram-positive strains investigated, especially in foods of low pH, such as fruit juices.

Introduction

THE POTENTIAL OF pulsed electric fields (PEF) to destroy undesirable microorganisms at temperatures below those used in thermal processing is very attractive for the food industry. It has been widely demonstrated that the application of an external electric field induces changes that cause a drastic increase in the permeability of the cytoplasmic membrane of the microorganisms (Aronsson *et al.*, 2005; García *et al.*, 2007). Although several theoretical models have been proposed, the underlying mechanisms of the electroporation of the cytoplasmic membrane at the molecular level have not yet been fully elucidated (Saulis, 2010).

The food industry requires microbial inactivation technologies to guarantee the safety and stability of foods. The efficacy of PEF to inactivate the vegetative cells of bacteria, yeasts, and molds has been widely demonstrated (Álvarez *et al.*, 2006). However, microbial resistance to PEF is extremely variable (García *et al.*, 2005; Saldaña *et al.*, 2009). For the most resistant microorganisms, obtaining microbial lethality

equivalent to thermal processing requires treatments of long duration or very high electric field strengths (Maresellés-Fontanet *et al.*, 2009). Several technical and economic limitations exist to upgrade the treatment chamber of the PEF apparatus to a large capacity to increase the residence time or to apply electric field strengths above 30 kV/cm (Toepfl *et al.*, 2007). An approach to increase the lethal effect of PEF with short treatment times at moderate electric field strengths involves combining this technology with other preservation factors in an overall preservation strategy (Raso and Barbosa-Cánovas, 2003).

The temperature and pH of the treatment medium are two factors that have been demonstrated to influence microbial inactivation by PEF (Wouters *et al.*, 2001). Generally, the highest microbial resistance to PEF is observed at temperatures below room temperature, and mild temperature elevation from this temperature causes a greater level of microbial inactivation even at temperatures that are not lethal for the microorganism (Heinz *et al.*, 2003; Sepúlveda *et al.*, 2005). The influence of pH on microbial inactivation by PEF is not as clear

¹Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain.

²Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec, Mexico.

as the influence of temperature. While some microorganisms are more PEF resistant at neutral pH, others are more PEF resistant at acidic pH, and, in some cases, the microbial PEF resistance is not affected by the pH (García *et al.*, 2005). However, the combined effects of pH and temperature on microbial inactivation by PEF have not yet been investigated.

The presence of naturally occurring antimicrobials such as nisin has been proven effective in increasing the lethality of PEF in both buffer systems and foods (Liang *et al.*, 2002; Gallo *et al.*, 2007). The presence of this antimicrobial agent offers interesting possibilities for increasing the efficiency of PEF in the media of different pH at different temperatures.

In this article, the effects of pH, temperature, and nisin on the inactivation caused by PEF in two PEF-resistant Gram-positive microorganisms, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, by PEF were investigated. A response surface model using a central composite design was developed for the purpose of understanding the individual effects and interactions of these factors and to identify the most promising combinations of these factors to achieve optimal microbial inactivation by PEF treatments that are applicable to an industrial scale.

Materials and Methods

Microorganisms and growth conditions

The strains of *L. monocytogenes* (STCC 5672) and *S. aureus* (STCC 4459) used in this investigation were supplied by the Spanish Type Culture Collection. In a previous study, it was demonstrated that these two strains were especially resistant to PEF (Saldaña *et al.*, 2009).

During this investigation, the cultures were maintained on slants of tryptic soy agar (Biolife, Milan, Italy) with 0.6% yeast extract added (Biolife) (TSAYE). A broth subculture was prepared by inoculating a test tube containing 5 mL of tryptic soy broth (Biolife) with 0.6% yeast extract (TSBYE) with a single colony, followed by incubation at 37°C for 18 h. With this subculture, a flask containing 50 mL of sterile TSBYE was inoculated to a final concentration of $\sim 10^6$ cells/mL. The culture was incubated under agitation (125 rpm) at 37°C until the stationary growth phase was reached (12 h for the *S. aureus* strain and 24 h for the *L. monocytogenes* strain).

PEF unit

The PEF unit used in this investigation was previously described by Saldaña *et al.* (2010). To obtain microbial inactivation data at different temperatures under a uniform electric field strength distribution and quasi-isothermal conditions, a batch parallel electrode treatment chamber with tempered electrodes, previously described, was used (Saldaña *et al.*, 2010). This chamber consists of a cylindrical polypropylene tube closed with two polished stainless steel cylinders of 2.01 cm² in surface area and 4 cm in length. The distance between electrodes was 0.25 cm and the volume of the treatment zone 0.5 mL.

Experimental design

A central composite design with three factors and face centered was the experimental design used to determine the effects and interactions of the temperature (T), pH, and nisin concentration (Nis) on the inactivation of both microorgan-

isms by a PEF at 30 kV/cm for 99 μ s (33 pulses of 3 μ s). The independent variables were pH (from 3.5 to 7.0), temperature (from 4°C to 50°C), and nisin concentration (from 0 to 200 μ g/mL). The central point was replicated several times to estimate the variance due to experimental and random variability. The rest of the experiments were repeated twice for each combination.

Microbial inactivation experiments

Before treatments, microorganisms were centrifuged at 6,000 g for 5 min at 4°C and resuspended in a citrate-phosphate Mcllvaine buffer of an electrical conductivity of 0.10 ± 0.01 S/m and different pH values (3.5, 5.25, and 7.0). Nisin was added to the corresponding media to obtain a concentration of 100 or 200 μ g/mL. The microbial suspension (0.5 mL) at a concentration of $\sim 10^8$ CFU/mL was placed into the treatment chamber with a sterile syringe.

Enumeration of viable cells

PEF-treated cell suspensions were serially diluted in 0.1% sterile peptone solution (Biolife). The medium used for enumeration of viable cells of all the strains was Tryptic Soy Agar (Biolife) plus 0.6% (w/v) of Yeast Extract (Biolife) (TSAYE), whose pH is 6.8 ± 0.1 . From the selected dilutions, 0.1 mL was pour plated into TSAYE and then plates were incubated at 37°C for 48 h to detect viable cells.

Statistical analysis

To determine the influence of temperature, pH, and the presence of nisin on the inactivation by PEF, the results obtained were analyzed by multiple regression applying response surface methodology (RSM). The results were fitted to a general quadratic model that accounted for the influence of the individual factors, T (X_1), pH (X_2), nisin concentration (X_3), interaction effects ($X_1 \times X_2$, $X_1 \times X_3$, and $X_2 \times X_3$), and quadratic effects (X_1^2 , X_2^2 , and X_3^2) of the investigated factors on the response (Eq. 1), where Y is the response variable to be modeled.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1 \times 2} (X_1 \times X_2) + \beta_{1 \times 3} (X_1 \times X_3) + \beta_{2 \times 3} (X_2 \times X_3) + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 \quad (1)$$

A backward regression procedure was used that systematically removes the effects that were not significantly associated ($p > 0.05$) with the response until a model with only a significant effect was obtained.

The central composite design, response fit analysis, regression coefficient estimations, and model significance evaluations were conducted using the software package Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

Results

Effect of temperature, pH, and nisin on inactivation of *L. monocytogenes* and *S. aureus* by PEF

The log₁₀ reductions caused by the PEF treatment under the experimental conditions investigated for the two strains are shown in Table 1. Inactivation of *L. monocytogenes* after applying a PEF treatment at 30 kV/cm for 99 μ s ranged from 0.1 to 5.9 log₁₀ reductions. PEF treatment at 4°C and pH 7.0

FACTORS INFLUENCING PEF MICROBIAL INACTIVATION

3

TABLE 1. RESPONSE SURFACE DESIGN AND EXPERIMENTAL RESULTS FOR *LISTERIA MONOCYTOGENES* 5672 AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 4459

Temperature (°C)	pH	Nisin (µg/mL)	S_t <i>Listeria</i> ^a	S_t <i>Staphylococcus</i> ^a
4.0	3.5	0	1.21 ± 0.03	2.87 ± 0.15
4.0	3.5	200	2.94 ± 0.08	3.48 ± 0.41
4.0	5.25	100	1.18 ± 0.08	3.20 ± 0.31
4.0	7.0	0	0.10 ± 0.05	1.31 ± 0.23
4.0	7.0	200	0.93 ± 0.28	3.36 ± 0.18
27.0	3.5	100	4.40 ± 0.06	3.80 ± 0.48
27.0	5.25	0	0.91 ± 0.21	3.76 ± 0.24
27.0	5.25	100	3.42 ± 0.15	4.03 ± 0.09
27.0	5.25	100	3.10 ± 0.32	4.01 ± 0.20
27.0	5.25	100	3.15 ± 0.25	3.90 ± 0.35
27.0	5.25	100	3.45 ± 0.02	4.30 ± 0.62
27.0	5.25	100	3.25 ± 0.26	3.90 ± 0.79
27.0	5.25	100	3.52 ± 0.01	4.19 ± 0.05
27.0	5.25	200	4.14 ± 0.88	4.12 ± 0.68
27.0	7.0	100	2.16 ± 0.07	3.59 ± 0.94
50.0	3.5	0	4.76 ± 0.19	4.45 ± 0.13
50.0	3.5	200	5.94 ± 0.30	4.90 ± 0.28
50.0	5.25	100	4.86 ± 0.10	4.56 ± 0.15
50.0	7.0	0	2.77 ± 0.15	4.33 ± 0.47
50.0	7.0	200	3.66 ± 0.36	4.53 ± 0.09

Pulsed electric field treatment conditions: electric field strength, 30 kV/cm; treatment time, 99 µs.

^aMicrobial inactivation in log₁₀ reductions ± standard deviation.

without nisin had little effect on viability of *L. monocytogenes*. However, 4.86 log₁₀ reduction or higher was achieved when the treatments were applied at 50°C in a medium of pH lower than 7.0 in the presence of nisin.

The viability loss of *S. aureus*, after the application of a PEF treatment at 30 kV/cm for 99 µs, ranged from 1.3 to 4.5 log₁₀ reductions. *S. aureus* was more sensitive than *L. monocytogenes* when treatments were applied at 4°C. At 50°C, *S. aureus* was more sensitive than *L. monocytogenes* when treated in a medium of pH 7.0, but at lower pH, the resistance of this microorganism was similar to or even higher than the *L. monocytogenes* resistance.

Mathematical modeling

The application of the multiple regression analysis to the experimental data corresponding to the log₁₀ cycles of inactivation resulted in the following second-order polynomial equations for *L. monocytogenes* (Eq. 2) and *S. aureus* (Eq. 3):

$$\text{Log } S = 3.01 + 0.07 \times T - 0.55 \times \text{pH} + 0.02 \times [\text{Nis}] - (5.13 \times 10^{-5}) \times [\text{Nis}]^2 \quad (2)$$

$$\text{Log } S = 0.03 + 0.05 \times T - 1.01 \times \text{pH} + (6.62 \times 10^{-3}) \times [\text{Nis}] - 0.12 \times \text{pH}^2 - (1.09 \times 10^{-4}) \times T \times [\text{Nis}] \quad (3)$$

where S represents the survival fraction; T represents the temperature (°C); pH represents the pH of the treatment medium; and $[\text{Nis}]$ represents the concentration of nisin (µg/mL).

The determination coefficient for each model was higher than 0.90. This means that less than 10% of the total response variation remained unexplained by the models developed.

According to the model F -values obtained, 55.42 for *L. monocytogenes* and 26.07 for *S. aureus* from the ANOVA analysis, the quadratic models were significant ($p < 0.001$).

The F -values for model parameters are very useful to indicate the significance of the effects of the variables and their interactions. In both microorganisms, the most significant effect on inactivation by PEF was the temperature, followed by pH, in the case of *L. monocytogenes* and nisin concentration in the case of *S. aureus*. This means that changes in these factors will have a very significant effect on microbial inactivation by PEF. The square of nisin and the square of pH were also significant values for the inactivation of *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. The presence of these square terms in Equations 2 and 3 means that when the nisin concentration or pH changes, their effects on the lethality of PEF are non-linear; that is, an increase in nisin concentration from 0 to 100 µg/mL will produce a greater change in PEF lethality than an increase from 100 to 200 µg/mL.

To validate the predictive performance of the quadratic models, they were validated with 27 different experiments for each microorganism within the treatment condition range used to generate the models. The values obtained in these experiments were graphically compared to the predicted values obtained from the quadratic models (Fig. 1). The bias factors (Bf) were 1.032 and 0.979 for Equations 2 and 3, respectively, and the accuracy factors (Af) were 1.107 and 1.119 for Equations 2 and 3, respectively. The results of the validation analysis indicated that the experimental values were in agreement with the predicted ones and that the experimental

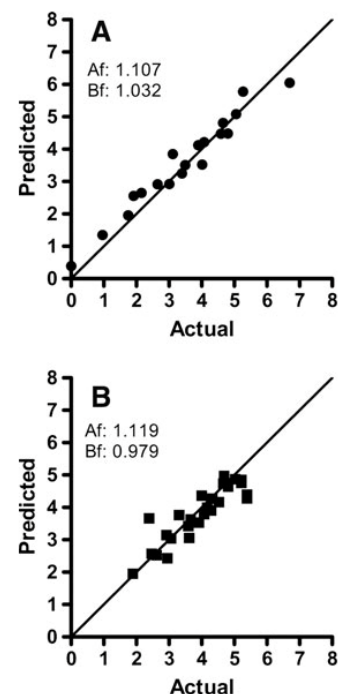


FIG. 1. Correlation between experimental and estimated data obtained with Eq. 2 for *Listeria monocytogenes* 5672 (A) and Eq. 3 for *Staphylococcus aureus* 4459 (B) treated by pulsed electric fields. Af, accuracy factor; Bf, bias factor.

points were evenly distributed around the equivalence line, so the quadratic models obtained were satisfactory and accurate in predicting the PEF inactivation of the strains of *L. monocytogenes* and *S. aureus* used in this study.

Predicting the combined effect of temperature, pH, and presence of nisin in PEF inactivation of S. aureus and L. monocytogenes

Figures 2 and 3 illustrate the influence of the factors investigated on the inactivation of both microorganisms by PEF. The graphical representations were obtained using the corresponding regression models for each microorganism (Eq. 2 and 3). As the influence of the factors investigated was different for both microorganisms, the most suitable representation was selected to show their effects. Figure 2A shows the influence of temperature on the PEF inactivation of *L. monocytogenes* at different pH in the absence and in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nisin. In the absence of nisin, the

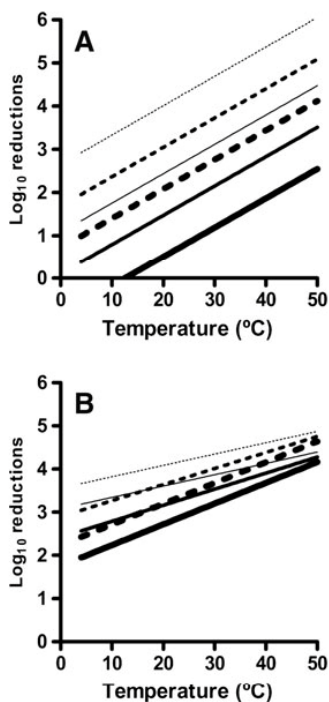


FIG. 2. Influence of temperature on the pulsed electric fields (PEF) inactivation predicted by Eq. 2 for *L. monocytogenes* 5672 (A) and Eq. 3 for *S. aureus* 4459 (B) at different pH in the absence and in the presence of nisin at pH from 3.5 to 7.0. PEF treatment conditions: field strength, 30 kV/cm; treatment time, 99 μs .

- (A)
 ■■■ pH 7.0, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin ■■■ nisin, pH 7.0, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin
 — pH 5.25, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin, - - - - pH 5.25, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin
 — pH 3.5, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin, - - - - pH 3.5, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin
- (B)
 ■■■ pH 7.0, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin ■■■ nisin, pH 3.5, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin
 — pH 7.0, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin, - - - - pH 3.5, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin
 — pH 7.0, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin, - - - - pH 3.5, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin

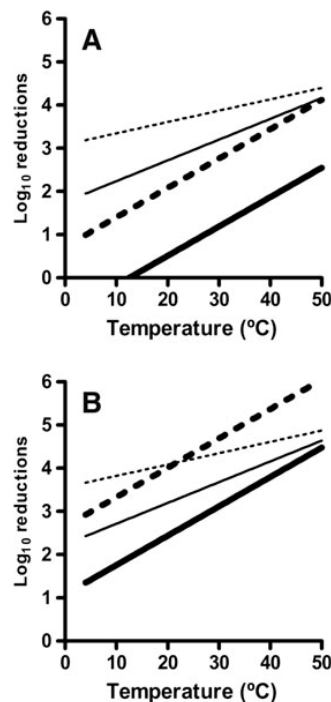


FIG. 3. Comparison of the PEF inactivation predicted by Eq. 2 for *L. monocytogenes* 5672 and Eq. 3 for *S. aureus* 4459 in media of pH 7.0 (A) and 3.5 (B) in the absence or in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nisin. PEF treatment conditions: field strength, 30 kV/cm; treatment time, 99 μs .

- ■ ■ *L. monocytogenes* 5672, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin; ■ ■ ■ *L. monocytogenes* 5672, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin
 — *S. aureus* 4459, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin; - - - - *S. aureus* 4459, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin

PEF inactivation of *L. monocytogenes* increased with increased treatment temperature and decreased pH. In the range of conditions investigated, the increment of lethality by increasing temperature was not influenced by pH. At any pH, a temperature increment of 20 °C increased the lethality of the treatment at around 1 log_{10} reduction. The influence of the temperature and pH in the presence of nisin was similar. The only effect of nisin was that it increased the lethality of the treatments at around 1 log_{10} reduction independently of the treatment temperature and pH. This effect was similar in the presence of 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nisin. The inactivation effect of nisin without applying PEF treatments at different temperatures in media of different pH for the time in which microorganisms were in contact with nisin during the application of the PEF treatment (2.5 min) was between 0.5 and 1 log_{10} reduction (data not shown). Therefore, the effect of the presence of nisin on the increment of PEF lethality was additive or slightly synergistic.

Figure 2B shows the influence of temperature on the PEF inactivation of *S. aureus* in the presence of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nisin in media of pH 3.5 and 7.0. PEF inactivation of *S. aureus* increased by increasing the treatment temperature in the range of pH and nisin concentration investigated. The influence of pH on the PEF inactivation of *S. aureus* was lower

FACTORS INFLUENCING PEF MICROBIAL INACTIVATION

5

than that of *L. monocytogenes*. When the pH decreased from 7.0 to 3.5, the inactivation only increased by around 0.5 log₁₀ reduction for any condition investigated. At both pH levels, the increment of the lethality of the PEF treatment in the presence of nisin decreased with the increments of temperature. No significant ($p > 0.05$) differences in PEF lethality were observed at 50°C in the absence or presence of this compound at a concentration of 100 or 200 µg/mL. The inactivation effect of nisin for the duration of the PEF treatment at 4°C was negligible (data not shown). Therefore, the effect of the presence of nisin on the increment of PEF lethality at these low temperatures was synergistic. This synergistic effect tended to disappear with increasing temperature.

Figure 3 compares the PEF resistance of both microorganisms in media of pH 7.0 (Fig. 3A) and 3.5 (Fig. 3B) in the absence or presence of 100 µg/mL of nisin. At pH 7.0, *L. monocytogenes* was more PEF resistant than *S. aureus*, but differences in resistance tended to disappear at higher temperatures in the presence of nisin. At pH 3.5, when nisin was not added, *L. monocytogenes* was slightly more resistant than *S. aureus*, especially at low temperatures. However, when 100 µg/mL of nisin was added, the lethality of the treatment was higher for *L. monocytogenes* at temperatures above 23°C. Under these conditions, more than 5 log₁₀ reductions in the population of *L. monocytogenes* were observed at temperatures greater than 35°C.

Discussion

In general, most studies published investigate the influence of only one single factor, such as pH, the presence of an antimicrobial agent, etc., on microbial inactivation by PEF (Aronsson and Röner, 2001; García *et al.*, 2005; Gallo *et al.*, 2007). In this study it was evaluated and modeled the combined effect of temperature, pH, and the presence of nisin on the inactivation of *L. monocytogenes* and *S. aureus* by a PEF treatment at an electric field strength and number of pulses applicable from an industrial point of view. This is the first attempt to model the influence of the presence of nisin on microbial inactivation by PEF in the range of pH of most foods in a wide range of temperatures.

According to the developed models, temperature showed the greatest influence on microbial inactivation by PEF. Incremental effect of PEF with temperature has been attributed to the temperature-related phase transition of the membrane phospholipids from gel to liquid-crystalline, which causes membranes to lose their elastic properties as temperature increases, making them more fluid and therefore more easily disrupted by the application of PEF (Stanley, 1991). In the range of experimental conditions investigated, an increase of the treatment temperature from 4°C to 50°C increased the lethality of the treatment by 3 log₁₀ reductions in *L. monocytogenes* and by 2 log₁₀ reductions in *S. aureus*. These results are in agreement with those of other studies in which the influence of the temperature on bacterial inactivation by PEF has been investigated (Heinz *et al.*, 2003; Sepúlveda *et al.*, 2005; Amiali *et al.*, 2007). However, in those investigations, it was difficult to quantify the effect of the temperature because they were conducted in continuous flow processes in which both treatment medium temperature and distribution of the electric field strength in the treatment chamber were not uniform, and, in

some experiments, lethal temperatures were reached after the treatment.

Treatment medium pH and the nisin concentration had a greater effect on the inactivation of *L. monocytogenes* than on the inactivation of *S. aureus*. In this investigation it has been demonstrated that the pH effect did not depend on the temperature of treatment. Independently of the temperature, the PEF resistance of both microorganisms increased by increasing pH. Results on influence of pH are in agreement with observations of other authors finding that, unlike the inactivation of Gram-negative bacteria, the PEF inactivation of Gram-positive microorganisms increases by decreasing the pH in the treatment medium (García *et al.*, 2005). The lower PEF resistance of Gram-positive bacteria in acidic conditions was related with the lower ability of these bacteria to repair the cytoplasmic membrane injury caused by PEF when treated at low pH (García *et al.*, 2005).

Since the cytoplasmic membrane is a common target of the antimicrobial peptide nisin and PEF treatment, the combination of PEF and nisin has been investigated to find synergistic effects that improve microbial lethality. However, as observed in this investigation, in general, an additive or slightly synergistic effect has been reported by other authors in different Gram-positive microorganisms when nisin is added before the PEF treatment (Calderon-Miranda *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2007). In this investigation, it has been observed for the first time that this effect may depend on the temperature of the applied PEF treatments. In the case of *S. aureus*, the influence of nisin in the treatment medium tended to disappear when the treatment temperature was increased from 4°C to 50°C.

To establish treatment conditions for PEF food pasteurization, it is necessary to identify the most PEF-resistant microorganisms of public health concern with respect to food (Lado and Yousef, 2003). The results obtained in this investigation demonstrated that the microorganisms of concern not only depend on the intrinsic microbial PEF resistance but also on treatment conditions applied and characteristics of the treatment medium. Our results indicate that, in general, *L. monocytogenes* was more PEF-resistant than *S. aureus*; however, when the highest inactivation was observed in both microorganisms (temperature 50°C, pH 3.5, and nisin concentration 200 µg/mL), the strain of *S. aureus* was more resistant than the strain of *L. monocytogenes* (Fig. 3A). Thus, before considering the use of PEF technology for preserving any specific food, it is necessary to evaluate the process conditions in the food of interest and with the microorganisms of concern.

In a previous study conducted in our laboratory, it was observed that the level of inactivation of these two Gram-positive pathogenic strains caused by PEF treatments applied at room temperature was inadequate to guarantee food safety. In this research study, it has been demonstrated that the application of PEF at temperatures above room temperature in the presence of antimicrobials such as nisin has great potential for achieving effective control of vegetative forms of the two PEF-resistant Gram-positive pathogenic strains investigated, especially in foods of low pH, such as fruit juices.

Acknowledgments

G.S. gratefully acknowledges the financial support for his doctoral studies from the Spanish Ministry for Science and

Innovation. H.M. thanks the financial support of National Council of Science and Technology (CONACyT) and Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE). This investigation has been funded by the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ) and CICYT (project AGL 2007-62738).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Álvarez I, Condón S, and Raso J. Microbial inactivation by pulsed electric fields. In: *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications*. Raso J and Heinz V (eds.). New York, NY: J. Springer, 2006, pp. 97–124.
- Amiali A, Ngadi MO, Smith JP, et al. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *J Food Eng* 2007;79:689–694.
- Aronsson K and Rönnér U. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2001;2:105–112.
- Aronsson K, Rönnér U, and Borch E. 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 Microbiol* 2005;99:19–32.
- Gallo LI, Pilosof AMR, and Jagus RJ. Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *J Food Eng* 2007;79:188–193.
- García D, Gómez N, Mañas P, et al. Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *Int J Food Microbiol* 2007;113:219–227.
- García D, Gómez N, Raso J, et al. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2005;6:388–395.
- Heinz V, Toepfl S, and Knorr D. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2003;4:167–175.
- Lado BH and Yousef AE. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:2223–2229.
- Liang Z, Mittal GS, and Griffiths MW. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric fields. *J Food Prot* 2002;65:1081–1087.
- Marsellés-Fontanet AR, Puig A, Olmos P, et al. Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *Int J Food Microbiol* 2009;130:159–165.
- Raso J and Barbosa-Cánovas GV. Non-thermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:265–285.
- Saldaña G, Puértolas E, Álvarez I, et al. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J Food Eng* 2010;100:349–356.
- Saldaña G, Puértolas E, López N, et al. 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 Sci Emerging Technol* 2009;10:160–165.
- Saulis G. Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Eng Rev* 2010;2:52–73.
- Sepulveda DR, Góngora-Nieto MM, San-Martin MF, et al. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2005;38:167–172.
- Stanley DW. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Clydesdale FM (ed.). New York: CRC Press, 1991, pp. 487–553.
- Toepfl S, Heinz V, Knorr D. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chem Eng Process* 2007;46:537–554.
- Wouters P, Álvarez I, Raso J. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Sci Technol* 2001;12:112–121.

Address correspondence to:

Ignacio Álvarez
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza
C/Miguel Servet 177
CP 50013 Zaragoza
Spain

E-mail: ialvalan@unizar.es

Manuscripto VI



Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields

G. Saldaña, S. Monfort, S. Condón, J. Raso, I. Álvarez*

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, CP 50013, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2010

Accepted 31 March 2011

Available online xxxx

Keywords:

Pulsed electric fields

Salmonella

E. coli

Hurdle technology

ABSTRACT

The aim of this investigation is to evaluate the concurrent influence of temperature (4–50 °C), pH (3.5–7.0), and the presence of nisin (up to 200 µg/mL) on the inactivation of two PEF-resistant Gram-negative, pathogenic bacteria, *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *Escherichia coli* O157:H7, using a PEF treatment of 30 kV/cm and 99 µs. A response surface model using a central composite design was developed for the purpose of understanding the individual effects and interactions of these factors.

The models showed that temperature was the factor with the greatest influence on the PEF inactivation in the two strains investigated. Increasing the treatment temperature from 4 to 50 °C increased the lethality of PEF up to at least 4 Log₁₀ reductions for both microorganisms at all pH levels investigated. PEF lethality varied with the square of the pH observing the highest microbial PEF sensitivity at pH 5.25 at all temperatures. The addition of nisin to the treatment medium did not influence the PEF lethality independently of the temperature.

PEF induced 1.0–1.5 Log₁₀ cycles of damaged cells at pH 3.5 for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and at pH 5.25 for *E. coli* O157:H7, independently of the temperature or the presence of nisin in the treatment medium.

The application of PEF at 50 °C permitted the achievement of 5 Log₁₀ reductions of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 in a range of pH from 4.2 to 6.7 and from 4.5 to 6.0, respectively. Therefore, the application of PEF at moderate temperatures has great potential for achieving effective control of Gram-negative pathogenic microorganisms in the range of pH found in most foods.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Salmonella spp. and *Escherichia coli* are well-known foodborne pathogens that frequently cause foodborne illness outbreaks (Anonymous, 2002; Vojdani, Beuchat, & Tauxe, 2008). In 2007, a total of 151,995 confirmed cases of human salmonellosis were reported in the EU (European Food Safety Authority, 2007). The ability of *Salmonella* spp. to adapt to adverse environmental conditions has caused researchers to rank this microorganism high on the surveillance list of foodborne disease outbreaks in several countries worldwide, making *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and serovar Enteritidis the most frequently isolated serovars. Outbreaks of salmonellosis have resulted from the consumption of various foods, including liquid foods with distinct pH, such as dairy and egg products or fruit juices (Anonymous, 2002). On the other hand, *E. coli* O157:H7 is recognized as an emerging foodborne pathogen responsible for approximately 73,000 cases annually in the USA (Rangel, Sparling, Crowe, Griffin, & Swerdlow, 2005). Products of different pH like unpasteurized milk, juice, and cider are potential liquid sources for this microorganism (Lund, Baird-Parker, & Gould, 2000).

Currently, the food industry's primary intervention to improve the microbiological safety of liquid food is thermal treatment. However, in order to avoid the negative effects of heat on sensory and nutritional properties of foods and to answer the increasing consumer's demand for high-quality, minimally processed foods, considerable efforts have been directed toward the development of novel nonthermal processes, such as pulsed electric fields (PEF) (Rajkovic, Smigic, & Devlieghere, 2010; Zwietering, 2002). PEF is a novel processing technology that has been demonstrated to be effective in inactivating different vegetative cells of pathogenic bacteria, including *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 at temperatures below those used in thermal processing (Amiali, Ngadi, Smith, & Raghavan, 2007; Evrendilek & Zhang, 2005; Jin, Zhang, Hermawan, & Dantzer, 2009; Monfort et al., 2010; Wouters, Álvarez, & Raso, 2001). The application of an external electric field causes also a sublethal injury in some of the microbial population, but it can be inactivated if recovery conditions are not suitable (García et al., 2005a; García, Somolinos, Hassani, Alvarez, & Pagán, 2009). Both lethality and the occurrence of cell damage are dependent on the microorganism and the environmental conditions (Cebrián, Sagarzazu, Pagan, Condon, & Manas, 2007; García, Gómez, Raso, & Pagán, 2005b; Lado & Yousef, 2003; Somolinos, García, Manas, Condon, & Pagan, 2008). A PEF treatment of 35 kV/cm and 300 µs that inactivated 5 Log₁₀ cycles of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 in a McIlvaine buffer of pH 5.5 reduced 4 and 2 Log₁₀ cycles at pH 3.5, respectively

* Corresponding author. Tel.: +34 976 76 26 75; fax: +34 976 76 15 90.
E-mail address: ialvalan@unizar.es (I. Álvarez).

(Saldaña, Puertolas, Condon, Alvarez, & Raso, 2010b). Therefore, it is essential to know not only the influence of those factors individually as they are generally described in the literature but their concurrent effect in order to evaluate the potential of PEF technology to eliminate pathogens that could be present in foods. On the other hand, since PEF lethality is very influenced by many factors, interactions of factors on microbial PEF resistance should be studied in a first approach in simple media instead of complex matrices like foods where particular components of the product can also interact on the microbial response hiding the actual interaction among factors. The pH of the treatment medium is one of the most influential factors related to PEF lethality and cell damage. Generally, Gram-negative bacteria are more PEF-resistant in media of low pH (García et al., 2005b), which has been attributed to the fact that in acidic conditions, a part of the microbial population is sublethally injured rather than inactivated. The damage to the sublethally injured population can be repaired after the treatment under suitable recovery conditions, and those that survive the treatment show higher PEF resistance.

The temperature of the treatment medium and the presence of antimicrobials also determine the microbial PEF resistance (Craven et al., 2008; Huang & Wang, 2009; McNamee et al., 2010; Walking-Ribeiro, Noci, Cronin, Lyng, & Morgan, 2009). Researchers have observed that PEF lethality increases with higher temperatures, even at non-lethal temperature levels. However, the underlying mechanisms by which PEF sensitivity increases with temperature are not clear. On the other hand, no one has evaluated the thermo-dependence of PEF lethality or cell damage at different pH levels, which could result in an interest to evaluate the potential of PEF for the hygienization of various products.

Finally, the presence of naturally-occurring antimicrobials, such as nisin, has been proven effective in increasing the lethality of PEF in both buffers and foods and in Gram-positive and Gram-negative bacteria (Gallo, Pílosof, & Jagus, 2007; McNamee et al., 2010; Sobrino-Lopez & Martín-Belloso, 2006; Terebiznik, Jagus, Cerrutti, de Huerdo, & Pílosof, 2000; Terebiznik, Jagus, Cerrutti, de Huerdo, & Pílosof, 2002; Zhang & Mittal, 2005). The utilization of this antimicrobial commonly used in the food industry offers interesting possibilities for increasing the efficiency of PEF in foods of different pH at distinct temperatures, mainly in Gram-negative bacteria. It is well known that Gram-negative bacteria are resistant to nisin because of their protective outer membrane that acts as a barrier against hydrophobic macromolecules like nisin (Helander & Mattila-Sandholm, 2000). The permeabilization effect of PEF treatments on cell envelopes could permit nisin pass the outer membrane and to act in the cytoplasmic membrane.

Therefore, the aim of this investigation is to explore the influence of pH, temperature and nisin, individually or in combination, on the lethality and cell damage caused by PEF in two PEF-resistant, Gram-negative bacteria, *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7. A response surface model using a central composite design was developed to understand the individual effects and interactions of these factors and to identify the most promising combinations of these factors to achieve a certain level of microbial inactivation and cell damage by applying PEF at an industrial scale (Granato, Branco, & Calado, 2011).

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

The strain of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 used in this investigation was supplied by the Spanish Type Culture Collection. The strain of *E. coli* O157:H7 used in this investigation is a VTEC- (Phage type 34) isolated by Dr. Chapman (Chapman et al., 1993). In a previous study, researchers demonstrated that these two strains were especially resistant to PEF (Saldaña et al., 2009). Broth subcultures were prepared by inoculating 5 mL tryptic soy broth (Biolife, Milan, Italy) plus 0.6% (w/v) of yeast extract (Biolife) (TSBYE) with a single colony and incubated for 18 h at 37 °C. This subculture was used to inoculate flasks

containing 50 mL of pre-warmed TSBYE to a final concentration of approximately 10^6 CFU/mL. The culture was incubated under agitation at 37 °C until the stationary growth phase was reached (24 h) (Saldaña et al., 2009).

2.2. PEF unit

The PEF equipment used in this investigation was previously described by Saldaña et al. (2010b, 2010c). To obtain microbial inactivation data at different temperatures under a uniform electric field-strength distribution and quasi-isothermal conditions, a batch parallel electrode treatment chamber with tempered electrodes was used (Saldaña, Puertolas, Alvarez, Meneses, Knorr & Raso, 2010a). This chamber consists of a cylindrical polypropylene tube closed with two polished stainless steel cylinders of 2.01 cm² in surface area and 4 cm in length. A dielectric oil (conductivity: 1.4 µS/cm) tempered at different temperatures was recirculated through the inner part of both electrodes to temper the treatment medium at different temperatures and to maintain a constant temperature in the medium during the PEF treatment. The distance between electrodes was 0.25 cm and the volume of the treatment medium 0.5 mL. The electrical resistance of the treatment chamber was 124 Ω. The actual voltage and current intensity applied were measured with a high-voltage probe (Tektronix, P6015A, Wilsonville, Oregon, USA) and a current probe (Stangenes Industries Inc., Palo Alto, California, USA), respectively, connected to an oscilloscope (Tektronix, TDS 220, Wilsonville, Oregon, USA). Treatment time was calculated by multiplying pulse width (3 µs) by the number of pulses applied.

2.3. Microbial inactivation experiments

Before treatments, microorganisms were centrifuged at 6000 ×g for 5 min at 4 °C and re-suspended in a citrate-phosphate Mcllvaine buffer with different pH levels (3.5, 5.25, and 7.0) (Dawson, Elliot, Elliot & Jones, 1974) in which concentration was adjusted to an electrical conductivity of 0.10 ± 0.01 S/m. Nisin was added to the corresponding media to obtain a range of concentrations up to 200 µg/mL. The microbial suspension (0.5 mL) at a concentration of approximately 10^8 CFU/mL was placed into the treatment chamber with a sterile syringe in the manner previously described by Raso, Álvarez, Condón and Sala (2000). Microorganisms were treated by a PEF treatment of 30 kV/cm for 99 µs and 89.1 kJ/kg (33 square wave pulses of 3 µs and 2.7 kJ/kg per pulse). Repetition frequency of pulses was 0.5 Hz.

2.4. Enumeration of viable and injured cells

PEF-treated and control cell suspensions were serially diluted in 0.1% (w/v) sterile peptone solution. From selected dilutions, 0.1 mL was pour plated into non-selective and selective agar medium plates. The non-selective agar medium used for enumeration of viable cells (non-damaged and damaged cells after PEF treatments) of the microorganisms was tryptic soy agar (Biolife, Milan Italy) plus 0.6% (w/v) of yeast extract (Biolife) (TSAYE). TSAYE was supplemented with NaCl (TSAYE + NaCl) (selective agar medium) at the optimal salt level to enumerate non-damaged cells (García, Gomez, Condon, Raso & Pagan, 2003). Concentrations used to detect damaged cells correspond to the highest NaCl concentrations that did not affect the growth of untreated cells (maximum non-inhibitory concentration). Based on previous results, this concentration for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 was 3% (w/v) (Saldaña et al., 2009).

Plates were incubated at 37 °C for 24 h to detect viable cells and for 48 h to detect damaged cells. Longer incubation times did not increase the microbial counts. Colonies were counted with an image analyzer automatic counter (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK) as previously described by Condón, Palop, Raso and Sala (1996). The existence of damaged cells after the treatment is determined by pour

plating samples on two different media; a non-selective media with suitable conditions, where cells may return to their native state by repairing the cellular damage; and a selective media, where injured cells cannot be repaired, and as a consequence, those cells die (Mackey, 2000).

2.5. Experimental design

A central composite design with three factors and face centered was the experimental design used to determine the effects and interactions of the temperature (T), pH, and nisin concentration (Nis) on the inactivation of both microorganisms by a PEF treatment at 30 kV/cm for 99 μ s and 89.1 kJ/kg. The independent variables were pH (from 3.5 to 7.0), temperature (from 4 to 50 °C), and nisin concentration (up to 200 μ g/mL). The central point was replicated several times to estimate the variance due to experimental and random variabilities. The rest of the experiments were repeated twice for each combination, and all experiments were executed in a randomized order to exclude the disturbing effects of environmental conditions.

2.6. Statistical analysis

To determine the influence of temperature, pH, and the presence of nisin on the inactivation by PEF, the results obtained were analyzed by multiple regression applying response surface methodology (RSM). The results were fitted to a general quadratic model that accounted for the influence of the individual factors, T (X_1), pH (X_2), nisin concentration (X_3), interaction effects, ($X_1 \times X_2$, $X_1 \times X_3$, $X_2 \times X_3$), and quadratic effects (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) of the investigated factors on the response (Eq. 1) where Y is the response variable to be modeled.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1x2}(X_1 \times X_2) + \beta_{1x3}(X_1 \times X_3) + \beta_{2x3}(X_2 \times X_3) + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 \quad (1)$$

A backward regression procedure was used, systematically removing the effects that were not significantly associated ($P > 0.05$) with the response until a model with only significant effects was obtained.

The central composite design, response fit analysis, regression coefficient estimations, and model significance evaluations were conducted using the software package Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

3. Results

3.1. Effect of temperature, pH, and nisin on the PEF lethality

Table 1 shows the Log_{10} cycles of inactivation of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 treated by PEF under the experimental conditions investigated and then recovered in non-selective and selective media. The PEF inactivation in non-selective media of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 ranged from 0.7 to 4.9 Log_{10} cycles and from 0.3 to 5.1 Log_{10} cycles, respectively. PEF lethality for both microorganisms was highly dependent on the pH and temperature of the treatment medium; however, the presence of nisin in the treatment medium did not significantly influence their PEF resistance ($p > 0.05$). Concerning the pH of the treatment medium, the highest PEF sensitivity for both microorganisms was observed at pH 5.25 at all temperatures investigated. This effect was more noticeable for *E. coli* O157:H7. The increments of the temperature at which PEF treatments were applied increased the PEF sensitivity of both bacteria. For *Salmonella* Typhimurium STCC 878, the effect of temperature was more remarkable at pH 3.5, i.e., when the temperature of the treatment medium was increased from 4 to 50 °C, PEF lethality increased 3.6, 2.1, and 2.3 Log_{10} cycles at pH 3.5, 5.25, and 7.0, respectively. In the case of *E. coli* O157:H7, raising the temperature from 27 to 50 °C was more effective to increase PEF sensitivity than raising it from 4 to 27 °C at all pH levels investigated. Comparing the PEF resistance of both microorganisms, *E. coli* O157:H7 was more resistant than *Salmonella* Typhimurium STCC 878 at pH 5.5 and 7.0. At pH 3.5, the PEF sensitivity of both microorganisms was similar.

The occurrence of cell damage in both microorganisms mainly depended on the pH of the treatment media, and not related to the temperature or the presence of nisin in the treatment medium. A maximum level of 1.0 to 1.5 Log_{10} cycles of damaged cells was detected

Table 1

Response surface design and experimental results for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7. PEF treatment conditions: electric field strength 30 kV/cm, treatment time 99 μ s.

T ^a	pH ^b	Nis ^c	<i>Salmonella</i> Typhimurium STCC 878				<i>E. coli</i> O157:H7			
			Non-selective ^d	CL 95% ^e	Selective ^d	CL 95% ^e	Non-selective ^d	CL 95% ^e	Selective ^d	CL 95% ^e
4	3.5	0	0.71*	0.23	1.86*	0.41	0.34	0.07	0.93	0.35
4	3.5	200	0.75*	0.17	2.24*	0.51	0.32	0.02	0.96	0.25
4	5.25	100	2.80	0.31	3.18	0.27	2.24	0.20	2.80	0.20
4	7.0	0	2.33	0.17	2.83	0.31	0.31	0.08	0.54	0.05
4	7.0	200	2.73	0.43	3.15	0.47	0.33	0.18	0.61	0.32
27	3.5	100	1.79*	0.02	3.42*	0.44	1.18	0.41	1.51	0.14
27	5.25	0	3.98	0.26	4.20	0.20	2.78	0.20	3.47	0.37
27	5.25	100	4.16*	0.25	4.74*	0.14	2.97	0.31	3.80	0.69
27	5.25	100	4.06	0.44	4.51	0.16	2.75	0.26	3.48	0.14
27	5.25	100	4.29	0.27	4.54	0.21	2.95	0.14	3.83	0.19
27	5.25	100	4.37	0.37	4.44	0.29	2.87	0.17	3.50	0.35
27	5.25	100	4.49	0.18	4.6	0.08	2.96	0.48	3.65	0.06
27	5.25	100	4.27	0.31	4.58	0.15	2.81	0.09	3.62	0.15
27	5.25	200	4.10	0.36	4.36	0.07	3.16	0.31	4.07	0.30
27	7.0	100	4.08	0.14	4.18	0.26	1.08	0.38	1.49	0.35
50	3.5	0	4.34*	0.20	5.06*	0.43	4.14	0.15	4.92	0.16
50	3.5	200	4.57*	0.27	5.47*	0.22	4.01	0.35	4.26	0.21
50	5.25	100	4.91	0.35	5.21	0.24	5.13	0.54	5.55	0.25
50	7.0	0	4.71	0.59	5.18	0.04	3.31	0.35	3.76	0.37
50	7.0	200	4.81	0.32	5.44	0.44	3.80	0.49	4.23	0.35

^a Temperature, in °C.

^b pH of the treatment medium.

^c Nisin concentration, in μ g/mL.

^d Microbial inactivation in Log_{10} units.

^e Confidence limit.

* Indicates significant differences ($p < 0.05$).

after the application of PEF treatments. These levels of cell damage were observed at pH 3.5 for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and at pH 5.25 for *E. coli* O157:H7.

3.2. Mathematical modeling

The application of the multiple regression analysis to the experimental data corresponding to the cycles of inactivation resulted in second-order polynomial equations for both *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 recovered in non-selective and selective media. Table 2 indicates the coefficients and *F* values for significant variables and their interactions for polynomial equations describing the relationship between the Log_{10} of inactivation and the temperature and pH of the treatment media for both microorganisms and recovery conditions after PEF treatments. A summary of the analysis of variance (ANOVA) for the selected quadratic models is also shown in Table 2. The determination coefficient for each model was higher than 0.94. This means that less than 6% of the total response variation remained unexplained by the developed models. The adjusted R^2 (R^2 -adj), which corrects the R^2 according to the sample size and the number of terms in the model (Haaland, 1989), were very similar to the corresponding R^2 , indicating that there is good agreement between the experimental and predicted values. This statement was confirmed based on the RMSE parameter (*root mean square error*) showing that all models produced predictions close to the observed data. The results of the *F* test indicate that the predicted and observed values for the models are not significantly different. A non-significant lack of fit *F* value ($p > 0.05$) was observed, indicating that the variation between samples was due only to the factors selected for the model and the pure error.

The *F* values for model parameters are very useful as indications of the significance of the effects of the variables and their interactions. For all models, the parameter *Nis* (nisin concentration) or any interaction of this parameter with pH or temperature was eliminated from the quadratic polynomial equations. This points out that this parameter was non-significant in the microbial PEF lethality or the occurrence of cell damage due to PEF in the range of conditions investigated. In both microorganisms, the most significant effect on inactivation by PEF was the temperature, followed by pH^2 . For *E. coli* O157:H7, T^2 also had a significant effect. This means that changes in these factors will have significant effect on the microbial inactivation by PEF and on the occurrence of cell damage. The significance of the squared factors (pH^2 and T^2) indicates that the trend of their influence was not linear. From a practical point of view, it could reveal the existence of an optima pH or temperature for the highest microbial PEF inactivation or cell damage generated by PEF treatments.

3.3. Predicting microbial inactivation and cell damage by PEF at different temperatures and pH levels

Figs. 1 and 2 illustrate the influence of the investigated factors on the inactivation of both microorganisms by PEF. The graphical representations were obtained using the corresponding developed second-order polynomial equations indicated in Table 2. Fig. 1 shows the Log_{10} cycles of inactivation of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 (1A) and *E. coli* O157:H7 (1B) treated by PEF at different temperatures and in treatment media with pH levels of 3.5, 5.25, and 7.0. As observed, for both microorganisms, PEF lethality increased with temperature at any pH. In the case of *Salmonella* Typhimurium STCC 878, this increment in lethality was linear. However, the thermodependence of PEF lethality was higher at pH 3.5 than at pH 7.0. For *E. coli* O157:H7, PEF lethality increased with the square of the temperature, so that a rise in the temperature in the range of 30 to 50 °C was more lethality effective than in the range from 10 to 30 °C. Similar PEF lethal effects were observed for *E. coli* O157:H7 at all pH. For both microorganisms, PEF sensitivity was higher at pH 5.25, and lower at pH 3.5 for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and at pH 3.5 and 7.0 for *E. coli* O157:H7. The effect of the pH of the treatment medium and its interaction with temperature on the PEF lethality of both microorganisms is more clearly shown in Fig. 2, which illustrates the Log_{10} cycles of inactivation of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 (A) and *E. coli* O157:H7 (B) treated by PEF in media of different pH and at temperatures of 4, 27, and 50 °C (continuous lines).

Fig. 2 also includes the Log_{10} cycles of inactivation of both microorganisms after PEF treatments recovered in selective media (dotted lines). The difference between the two lines indicates the Log_{10} cycles of damaged cells due to PEF treatments. For *Salmonella* Typhimurium STCC 878, cell damage decreased by augmenting the pH at all temperatures, and there was hardly any cell damage at temperatures of 50 °C. For this microorganism, the highest number of damaged cells occurred at pH 3.5 and was the greatest at 4 °C (1.6 Log_{10} cycles of damaged cells). For *E. coli* O157:H7, the highest number of damaged cells occurred at pH 5.25, independently of the temperature of the treatment medium. However, the level of damaged cells was lower than in *Salmonella* Typhimurium STCC 878 (a maximum of 0.9 Log_{10} cycles of damaged cells).

Figs. 1 and 2 contain useful graphs to compare the PEF resistance of both Gram-negative bacteria and to evaluate the potential of PEF technology as a hygienization system for products with different pH. As observed, *E. coli* O157:H7 had greater PEF resistance at all pH levels and temperatures investigated, mainly at pH 7.0. The application of PEF treatments at 50 °C will permit achieving 5 Log_{10} reductions of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 in a range of pH from 4.2 to 6.7 and from 4.5 to 6.0, respectively. When cell damage is considered, this range of pH would be extended. Thus, for *Salmonella*

Table 2

F value for significant variables and their interactions for polynomial equations of *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 recovered in non-selective and selective media after a PEF treatment.

	<i>Salmonella</i> Typhimurium STCC 878				<i>E. coli</i> O157:H7			
	Non-selective		Selective		Non-selective		Selective	
	Coefficient	<i>F</i> value	Coefficient	<i>F</i> value	Coefficient	<i>F</i> value	Coefficient	<i>F</i> value
Intercept	-10.33		-2.71		-12.84		-13.93	
T	0.11	197.77*	0.08	230.66*	-0.015	757.79*	-0.004	349.91*
pH	4.27	42.39*	1.88	4.82	5.76	3.71	6.45	4.70
T^2	-	-	-	-	0.002	63.43*	0.001	22.84
pH^2	-0.35	56.82*	-0.15	15.17	-0.55	247.17*	-0.62	143.93*
T*pH	-0.009	11.16	-0.005	5.38	-	-	-	-
R^2		0.95		0.94		0.98		0.97
R^2 -adj		0.94		0.93		0.98		0.96
RMSE		0.54		0.43		0.33		0.38
<i>F</i> value		77.035		64.008		253.01		126.92
Lack of fit		5.972		8.94		6.69		5.11

* $P > F$ value = 0.0001.

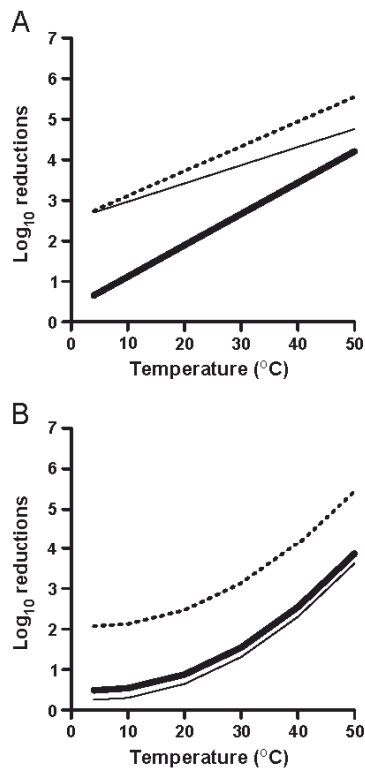


Fig. 1. Influence of the temperature on the PEF inactivation at different pH predicted by the mathematical models developed for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 (1A) and *E. coli* O157:H7 (1B). Treatment conditions: electric field strength 30 kV/cm; treatment time 99 μ s; pH 3.5 (thick line), 5.25 (dotted line) and 7.0 (thin line).

Typhimurium STCC 878, 5 Log₁₀ cycles could be achieved from pH 3.5 to 6.7, and in the case of *E. coli* O157:H7, the range of pH would be from 3.8 to 6.5 to reduce 5 Log₁₀ cycles its population.

4. Discussion

PEF is a non-thermal preservation technology that has been proposed as an alternative to heat pasteurization for liquid foods (Barbosa-Cánovas & Sepúlveda, 2005). However, based on published data, the level of inactivation of pathogenic bacteria achieved with the sole application of PEF (lower than 2 Log₁₀ cycles) limits the applicability of PEF as a pasteurization alternative (Jin, Zhang, Hermawan & Dantzer, 2009; McNamee et al., 2010; Monfort et al., 2010; Saldaña et al., 2010b, 2010c; Sepulveda, Gongora-Nieto, Guerrero & Barbosa-Canovas, 2009). In order to increase the lethality of PEF treatments or to reduce their intensity to achieve a certain level of microbial inactivation, PEF has been combined with other hurdles (temperature, antimicrobials, etc.) (Noci et al., 2008; Pina-Perez, Silva-Angulo, Rodrigo & Martinez-Lopez, 2009; Raso & Barbosa-Cánovas, 2003; Walkling-Ribeiro, Noci, Cronin, Lyng & Morgan, 2008). The occurrence of cell damage due to PEF has also permitted to design PEF-based combined processes since damaged cells are more easily inactivated by the subsequent or simultaneous application of hurdles (García et al., 2009; McNamee et al., 2010; Zhao, Yang & Wang, 2009). Both microbial inactivation and the occurrence of cell damage are very dependent on environmental factors like pH, temperature, etc. Most of the studies on the influence of these factors on the microbial inactivation and cell damage by PEF have focused on the influence of only one factor. In order to design suitable PEF-combined processes, it is also necessary

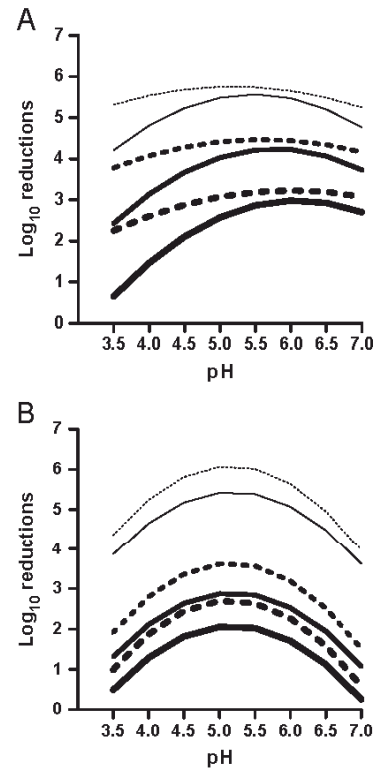


Fig. 2. Influence of the pH on the PEF inactivation at different temperatures predicted by the mathematical models developed for *Salmonella* Typhimurium STCC 878 (A) and *E. coli* O157:H7 (B), recovered in non-selective media (continuous lines) and selective media (dotted lines). Treatment conditions: electric field strength 30 kV/cm; treatment time 99 μ s; treatment temperatures 4 (—) and 50 °C (···).

to know the influence of these factors acting simultaneously on the PEF resistance and the occurrence of cell damage. In this investigation, the concurrent influence of temperature, pH, and the presence of nisin on the inactivation of two Gram-negative pathogenic bacteria, *Salmonella* Typhimurium STCC 878 and *E. coli* O157:H7 have been evaluated for the first time, using a PEF treatment at an electric field strength and a number of pulses applicable from an industrial point of view (Toepfl, Heinz & Knorr, 2007). The treatments were applied in a tempered-parallel-electrode batch treatment chamber to utilize the most uniform PEF treatments in terms of electric field strength, time, and temperature in order to minimize non-controlled interactions of electric field strength and temperature (Jaeger, Meneses & Knorr, 2009; Jaeger, Meneses, Moritz & Knorr, 2010).

According to the developed models, the factor showing the greatest influence on microbial inactivation by PEF of the two pathogens investigated was temperature. In the range of experimental conditions investigated, an increase of the treatment temperature from 4 to 50 °C increased the lethality of the treatment at least to 4 Log₁₀ reductions for both microorganisms at all pH levels (Figs. 1 and 2). The improvement of PEF lethality with temperature has already been described in the literature (Amiali et al., 2007; Bazhal, Ngadi, Raghavan & Smith, 2006; Heinz, Toepfl & Knorr, 2003). However, in these investigations, it was difficult to evaluate the effect of temperature since they were conducted in continuous flow in which the inlet and outlet temperatures of the product were not the same. Previous researchers indicated that the incremental rate of inactivation with temperature could be due to the temperature-related phase transition of the membrane phospholipids from gel to liquid-crystalline, which causes membranes to lose their elastic properties as temperature increases, making them more fluid and

therefore more easily disrupted by the application of PEF (Stanley, 1991). Based on our results, the increase of PEF lethality with temperature is not related to a higher occurrence of cell damage even at the highest investigated temperatures (50 °C) (Fig. 2). Furthermore, at these temperatures hardly any damage was observed in either microorganism. This lack of damage indicates that this temperature is not sufficient to damage the microorganisms due to thermal effects. Therefore, the observed lethality is probably due to PEF becoming sensitized to the temperature.

Since the antimicrobial activity of nisin involves an interaction with peptidoglycan precursors and the formation of transient pores in the cytoplasmic membrane (Helander & Mattila-Sandholm, 2000), the nonexistence effect of nisin in both microorganisms could indicate that PEF did not affect the outer membrane. The application of PEF treatments even at 50 °C would not be sufficient to reduce the protective effect of the outer membrane of Gram-negative bacteria against hydrophobic macromolecules like nisin, limiting its action on the cytoplasmic membrane. The effect of nisin on Gram-negative bacteria observed by other authors could be due to temperatures over 50 °C achieved, which can affect the outer membrane (Boziaris, Humpheson & Adams, 1998; Terebiznik et al., 2000; Terebiznik et al., 2002).

Results obtained in this investigation on the influence of pH on the microbial PEF lethality and occurrence of cell damage are similar to observations made by other authors during experiments done at room temperature. Some researchers stated that PEF resistance of Gram-negative bacteria increased in acidic conditions because those conditions allowed them a higher ability to repair the cytoplasmic membrane after it was extensively damaged (García et al., 2005b; Saldaña et al., 2010b). In this investigation, the higher PEF resistance in acidic conditions and occurrence of cell damage in Gram-negative bacteria were confirmed under a whole range of temperatures investigated from 4 to 50 °C (Figs. 1 and 2). From a practical point of view, the high PEF resistance of Gram-negative bacteria in acidic products could limit the applicability of PEF technology to pasteurize these products. However, the application of PEF treatments at temperatures over room temperature opens the possibility that this technology could be used to process acidic products like fruit juices. The application of PEF treatments at 50 °C would permit to achieve 5 Log₁₀ cycles of inactivation of both Gram-negative bacteria in a wide range of pH levels. This range of pH levels could be even larger if recovery mechanisms of PEF-damaged cells are avoided by, for example, adding antimicrobials which were capable of working against Gram negative bacteria to the treatment medium, by storing PEF-treated products at 4 °C, etc. (García et al., 2009; McNamee et al., 2010; Pina-Perez et al., 2009; Zhang & Mittal, 2005).

To establish the optimal treatment conditions for PEF food pasteurization, it is necessary to identify the most PEF-resistant microorganisms of public health concern with respect to food (Lado & Yousef, 2003). In this investigation, the most PEF resistant strains of *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* among five different strains of each microorganism were used (Saldaña et al., 2009). The results obtained in this study confirm that *E. coli* O157:H7 was the most PEF-resistant Gram-negative bacteria of the two investigated at all pH levels and temperatures studied. Although more studies must be done with other strains and microorganisms and to validate in real matrices, the results of this study indicate that the application of PEF at moderate temperatures has a great potential for achieving an effective control of Gram-negative pathogenic bacteria in the range of pH of most foods.

Acknowledgments

The authors thank the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ) and CICYT (project AGL 2007-62738) for the support. G.S. and S. M. gratefully acknowledge the financial support for their doctoral studies from the Spanish Ministry for Education and Science and the Department of Science, Technology and University of the Aragon Government.

References

- Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., & Raghavan, G. S. V. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 79, 689–694.
- Anonymous (2002). *Salmonella Annual Summary 2002*. Department of Health and Human Services – Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Atlanta, Georgia 30333: Foodborne and Diarrheal Diseases Branch.
- Barbosa-Cánovas, G. V., & Sepúlveda, D. (2005). Present status and the future of PEF technology. In G. V. Barbosa-Cánovas, M. S. Tapia, & M. P. Cano (Eds.), *Novel food processing technologies* (pp. 1–44). Florida: Boca Raton.
- Bazhal, M. I., Ngadi, M. O., Raghavan, G. S. V., & Smith, J. P. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments. *LWT- Food Science and Technology*, 39, 419–425.
- Boziaris, I. S., Humpheson, L., & Adams, M. R. (1998). Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 7–13.
- Cebrián, G., Sagarazu, N., Pagan, R., Condon, S., & Manas, P. (2007). Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 304–311.
- Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, J., & Crick, E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, 111, 439–447.
- Condon, S., Palop, A., Raso, J., & Sala, F. J. (1996). Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 149–152.
- Craven, H. M., Swiergon, P., Ng, S., Midgely, J., Versteeg, C., Coventry, M. J., et al. (2008). Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for inactivation of *Pseudomonas* and enhancement of milk shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 211–216.
- Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H., & Jones, K. M. (1974). pH and buffers. In C. Press (Ed.), *Data for biochemical research* (pp. 475–508). Oxford.
- European Food Safety Authority, E.C.F.D.P.a.C. (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006 *The European Union* 130. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/223r.htm>. Website last accessed: November 2, 2010.
- Evrendilek, G. A., & Zhang, Q. H. (2005). Effects of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields-induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Engineering*, 68(2), 271–276.
- Gallo, L. I., Pilosof, A. M. R., & Jagus, R. J. (2007). Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *Journal of Food Engineering*, 79, 188–193.
- García, D., Gómez, N., Condon, S., Raso, J., & Pagan, R. (2003). Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 140–144.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condon, S., Raso, J., & Pagan, R. (2005a). Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 94–104.
- García, D., Gómez, N., Raso, J., & Pagan, R. (2005b). Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 388–395.
- García, D., Somolinos, M., Hassani, M., Alvarez, I., & Pagan, R. (2009). Modeling the inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Safety*, 29(4), 546–563.
- Granato, D., Branco, G. F., & Calado, V. M. A. (2011). Experimental design and application of response surface methodology for process modeling and optimization: A review. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.008.
- Haaland, P. D. (1989). Statistical problem solving. In M. Decker (Ed.), *Experimental design in biotechnology* (pp. 1–18). New York and Basel.
- Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 167–175.
- Helander, I. M., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 153–161.
- Huang, K., & Wang, J. P. (2009). Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering*, 95, 227–239.
- Jaeger, H., Meneses, N., & Knorr, D. (2009). Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution, flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 470–480.
- Jaeger, H., Meneses, N., Moritz, J., & Knorr, D. (2010). Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing. *Journal of Food Engineering*, 100, 109–118.
- Jin, T., Zhang, H., Hermawan, N., & Dantzer, W. (2009). Effects of pH and temperature on inactivation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in liquid whole egg by pulsed electric fields. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 367–372.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2003). Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2223–2229.
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, W. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers, Inc..

- Mackey, B. (2000). Injured bacteria. In M. L. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The microbiological safety and quality of foods*. MD, Aspen: Gaithersburg pp.
- McNamee, C., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., Morgan, D. J., & 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.
- Monfort, S., Gayán, E., Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., et al. (2010). Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields in liquid whole egg. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 306–313.
- Noci, F., Riener, J., Walkling-Ribeiro, M., Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2008). Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of Food Engineering*, 85, 141–146.
- Pina-Perez, M. C., Silva-Angulo, A. B., Rodrigo, D., & Martinez-Lopez, A. (2009). Synergistic effect of pulsed electric fields and CocanOX 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, 196–204.
- Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S29–S42.
- Range, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., & Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 603–609 <http://www.adiveter.com/ftp/articles/articulo1622> Web page, pdf accessed November 2, 2010
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., & Sala, F. J. (2000). Predicting inactivation of *Salmonella* Senftenberg by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 21–30.
- Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 265–285.
- Saldaña, G., Puertolas, E., Alvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., & Raso, J. (2010a). Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering*, 100, 349–356.
- Saldaña, G., Puertolas, E., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2010b). 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, 290–298.
- Saldaña, G., Puertolas, E., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2010c). Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Food Microbiology*, 27, 550–558.
- Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, 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, 160–165.
- Sepulveda, D. R., Gongora-Nieto, M. M., Guerrero, J. A., & Barbosa-Canovas, G. V. (2009). Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 735–739.
- Sobrinho-Lopez, A., & Martin-Belloso, O. (2006). Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection*, 69, 345–353.
- Somolinos, M., Garcia, D., Manas, P., Condon, S., & Pagan, R. (2008). Effect of environmental factors and cell physiological state on pulsed electric fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 260–267.
- Stanley, D. W. (1991). Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. In F. M. Clydesdale (Ed.), *Critical reviews in food science and nutrition* (pp. 487–553). New York: CRC Press.
- Terebiznik, M. R., Jagus, R. J., Cerrutti, P., de Huergo, M. S., & Pilosof, A. M. R. (2000). Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 63, 741–746.
- Terebiznik, M., Jagus, R., Cerrutti, P., de Huergo, M. S., & Pilosof, A. M. R. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *Journal of Food Protection*, 65, 1253–1258.
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 537–546.
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2), 356–634.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 73, M395–M399.
- 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.
- Wouters, P., Álvarez, I., & Raso, J. (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 112–121.
- Zhang, Y., & Mittal, G. S. (2005). Inactivation of spoilage microorganisms in mango juice using low energy pulsed electric field in combination with antimicrobials. *Italian Journal of Food Science*, 17, 167–176.
- Zhao, W., Yang, R. J., & Wang, M. (2009). Cold storage temperature following pulsed electric fields treatment to inactivate sublethally injured microorganisms and extend the shelf life of green tea infusions. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 204–208.
- Zwietering, M. H. (2002). Quantification of microbial quality and safety in minimally processed foods. *International Dairy Journal*, 12, 263–271.

Manuscrito VII

Submitted

Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization

Saldaña G., Álvarez, I., Condón, S. and Raso, J*

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain.

Abstract

Processing unit operations for the purpose of inactivating harmful microorganisms are of primary importance in ascertaining the safety of food. The capability of Pulsed Electric Fields (PEF) to inactivate vegetative cells of microorganisms at temperatures below those used in thermal processing makes this technology very attractive for the food industry as a non-thermal pasteurization process. Commercial exploitation of this technology for food pasteurization requires identifying the most PEF-resistant microorganisms of public health concern and defining the treatment conditions that would reduce the population of these microorganisms to a level that guarantees food safety. The objective of this paper is to summarize studies carried out in the last years, including those conducted within the framework of EU FP6 integrated project Novel Q, in order to enhance the feasibility of using PEF technology for food pasteurization

Introduction

Traditionally, the objectives of food preservation were to extend the foods' shelf-life and to provide a safe product. Today the food industry is expected to offer safe foods but also prevent or reduce the negative impact of the preservation techniques on valuable food compounds (da Cruz et al., 2010). Recently, various new food preservation technologies are under investigation by the food industry so it can meet consumers' demands for nutritious, fresh food products with high organoleptical properties (Rajkovic, Smigic & Deliveghere, 2010).

The application of non-thermal processes for food preservation is a technological response to the undesirable changes induced by thermal processing in food (Arnoldi, 2002). Non-thermal technologies are processes capable of inactivating microorganisms at temperatures below those normally used in thermal processing (Barbosa-Cánovas, Tapia & Cano, 2005). One such non-thermal method is Pulsed Electric Fields technology (PEF), which exposes the food to intermittent electric fields of high intensity for short periods of time (μ s). A number of researchers have demonstrated that the application of these treatments provokes an electromechanical instability in the cell membrane that modifies its permeability, causing the inactivation of vegetative forms of bacteria, yeast, and molds (Saulis, 2010). However, this technology fails to inactivate bacterial spores, probably because the spore envelopes, such as the coat and the cortex, prevent the permeabilization effects of PEF on the spore cytoplasmic membrane (Pagán, Esplugas, Góngora-Nieto, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1998). As bacterial spores are resistant to PEF treatments, its main applications in food preservation must be focused on pasteurization.

The objective of pasteurization is to minimize any possible health hazards arising from pathogenic microorganisms to a level that is not likely to represent a public health risk under normal conditions of distribution and storage (NACMCF, 2006). Although the main objective of PEF pasteurization is to guarantee food safety, a large proportion of the population of vegetative

spoilage microorganisms is also inactivated by the treatment. Therefore, PEF treatments may contribute to extend the shelf-life of foods (El-Hag, Jayaram & Griffiths, 2006; Min, Evrendilek & Zhang, 2007). However, as the treatment is not capable of achieving commercial sterility, since spores or other no public health significant microorganisms can be present, other preservation techniques, such as refrigeration, atmosphere modification, the addition of preservatives, or a combination of these techniques, will be required to preserve the quality and stability of the food during its distribution and storage (Raso & Barbosa-Cánovas, 2003).

PEF is gaining interest in the food industry as a gentle method of food preservation; however, the commercial exploitation of this technology for food pasteurization requires demonstrating that PEF promotes an equivalent microbial safety, as compared with traditional processing. Table 1 shows the recommended guidelines for the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 2006) for establishing the efficacy and equivalence of alternative methods of pasteurization. The objective of this paper is to summarize studies carried out in the last years, including those conducted within the framework of EU FP6 integrated project Novel Q, in order to enhance the feasibility of using PEF technology for food pasteurization according to the guidelines shown in table 1. Therefore this review will be mainly focused on data obtained on inactivation of pathogenic microorganisms that may represent a public health risk.

Selecting strains of pathogenic microorganisms to design pasteurization processes by PEF

In order to establish the treatment conditions for PEF food pasteurization, the first step is to identify the most PEF-resistant microorganisms in foods that have an impact on public health. This identification depends on the intrinsic PEF resistance of the microbes, but also other factors, such as the treatment medium characteristics or the physiological state of the cells, which can influence

microbial resistance (Aronsson & Rönner 2001; Cebrián, Sagarzazu, Pagán, Condón & Mañas, 2007).

Researchers have observed that there is no relationship between microbial resistance and the inactivation procedure used. For example, *Salmonella* Senftenberg 775W, which is a very heat-resistant microorganism, is more sensitive to high hydrostatic pressure or PEF than other heat-sensitive *Salmonellae* (Álvarez, Raso, Palop & Sala, 2000; Metrick, Hoover & Farkas, 1989). Therefore, the target microorganism for PEF pasteurization is not necessarily the same as the target microorganism for pasteurization by heat or other inactivation treatments.

Table 1. Guidelines recommended by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 2006) for developing a pasteurization process

- Identify the microorganism (s) of public health concern for the food
- Determine the most resistant pathogen of public health concern that is likely to survive the process
- Assess the level inactivation needed
- Consider the impact of the food matrix on pathogen survival
- Validate the efficacy of the pasteurization process
- Define the specific equipment and operating parameters for the proposed pasteurization process

Efficacy of PEF against pathogenic microorganisms is generally based on single-strain studies; consequently, there is limited information available in the literature on variations of resistance to PEF among strains of the same microorganism. The few studies conducted have demonstrated that the PEF resistance of different strains of bacterial species may vary greatly. Inactivation of nine *Listeria monocytogenes* strains by a PEF treatment (25 kV/cm, 144 μ s) ranged from 0.7 to 3.7 \log_{10} CFU/ml (Lado & Yousef, 2003) and inactivation of fifteen *Staphylococcus aureus* strains by a PEF treatment (22 kV/cm, 200 μ s) from 1.2 to 4.0 \log_{10} CFU/ml (Rodríguez-Calleja, Cebrián, Condón & Mañas, 2006). Therefore, studies of the variability in PEF resistance of different strains of pathogenic microorganisms is required to identify potential target microorganisms before designing PEF pasteurization processes.

Published research on the influence of the characteristics of the food matrix indicates that microbial PEF resistance varies considerably within the pH range of the treatment medium. Researchers have reported that a variation of the pH of the treatment medium can increase, reduce, or have no effect in modifying the microbial sensitivity to PEF. Generally, Gram-positive microorganisms are more PEF resistant in media of neutral pH, and Gram-negative ones are more resistant in media of acidic pH (García, Gómez, Raso & Pagán, 2005).

In the Novel Q project, the PEF resistance of five strains of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Typhimurium were investigated in order to identify microbial targets for PEF pasteurization (Saldaña, Puértolas, López, García, Álvarez & Raso, 2009). The screening study confirmed that the PEF resistance of strains of a given bacteria and of strains of different bacteria may vary significantly. As the most resistant strains at low pH are not necessarily the most resistant at neutral pH, the target microorganisms for PEF pasteurization could be expected to be different for foods, depending on their pH. Table 2, that compares the resistance of the most PEF-resistant strains found in the screening study with data published, shows that these strains are especially PEF resistant and therefore they should be taken into consideration as possible target microorganisms in future research.

In order to conduct challenge studies for plant validation of processes in industries, surrogate microorganisms in place of target pathogens are used. Surrogates are non-pathogenic strains that respond to a particular treatment in a manner equivalent to a pathogenic species. Although surrogates for thermal processing have been selected at the moment, only one study with this purpose, for PEF processing, has been published (Gurtler, Rivera, Zhang & Geveke, 2010). These authors selected surrogate bacteria in place of *E. coli* 0157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for PEF treatment of orange juice. As the selection of surrogate bacteria may depend on the food on interest, further studies will be required to identify non-pathogenic surrogates to validate PEF pasteurization of other products by challenge studies.

Modelling PEF inactivation of target microorganisms in order to design pasteurization processes.

Once the target microorganisms have been identified, the next step in designing a pasteurization process is to establish the frequency or maximum concentration of this microorganism that is considered acceptable for public protection. This concept is called *Food Safety Objective* (FSO) (ICMSF, 2002). The FSO should be established by regulatory agencies, and it is based on the infectious dose of the target microorganism and on its ability to grow in the food under normal distribution and storage conditions.

Reducing the target microorganism to an appropriate level to protect the public health is dependent on its initial cell number in raw materials before pasteurization, taking into consideration the normal variation in concentration and the FSO. This reduction in the target microorganism is known as *Performance Criterion*, and it is defined as the required outcome of a step or a combination of steps that can be applied to ensure a FSO (ICMSF, 2002). An example of a performance criterion is the required 5 \log_{10} reduction of the most resistant microorganism of public health significance established by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) concerning juice pasteurization (FDA, 2001). Traditionally, different reduction values have been defined for thermal pasteurization of various foods, depending on the pathogen of concern (IFT, 2004). Since studies have demonstrated that these reduction values afford an appropriate level of public health protection, they could also be used as a reference for pasteurization by PEF or other novel technologies. FSO and/or *Performance Criterion* that should be established

Table 2. Comparison of the PEF resistance of different pathogenic microorganisms.

Pathogen	Treatment media	Treatment conditions	Log reduction	Reference
<i>E. coli</i> O157:H7	McIlvaine buffer pH 4.0	30 kV/cm; 150 μ s; 24°C	0.5	Saldaña et al. (2009)
	McIlvaine buffer pH 7.0	30 kV/cm; 150 μ s; 24°C	1.7	
	Apple juice	34 kV/cm, 166 μ s, 30°C	4.0	Evrendilek et al., (2000)
	Apple juice	31 kV/cm, 202 μ s, 30°C	2.6	Evrendilek & Zhang (2005)
	Apple juice	32.2 kV/cm, 35°C	4.96	Ukuku et al. (2010)
<i>L. monocytogenes</i> STCC 5672	Liquid egg yolk	30 kV/cm, 310 μ s, 40°C	4.9	Amiali et al. (2007)
	McIlvaine buffer pH 4.0	30 kV/cm; 150 μ s; 24°C	1.5	Saldaña et al. (2009)
<i>L. monocytogenes</i>	McIlvaine buffer pH 7.0	30 kV/cm; 150 μ s; 24°C	0.6	Mosqueda-Melgar, et al. (2007)
	Melon juice	35 kV/cm, 2000 μ s, 39°C	4.3	
<i>S. aureus</i> STCC 4459	LWE	30 kV/cm, 300 μ s	3.5	Reina et al. (1998)
	McIlvaine buffer pH 4.0	25 kV/cm; 150 μ s; 24°C	2.6	Saldaña et al. (2009)
	McIlvaine buffer pH 7.0	25 kV/cm; 150 μ s; 24°C	2.0	
<i>S. aureus</i>	LWE	25 kV/cm, 60 μ s, 24°C	1.5	Monfort et al. (2010)
	Skim milk	25 kV/cm, 450 μ s	3.3	Evrendilek et al. (2004)
	Skim milk	31 kV/cm, 6 μ s	3.0	Sobrino-López et al. (2006)
	Orange juice	20 kV/cm, 150 μ s	2.0	Walkling-Ribeiro et al. (2009b)
<i>Salmonella</i> Typhimurium STCC 878	McIlvaine buffer pH 4.0	30 kV/cm; 150 μ s; 24°C	4.2	Saldaña et al. (2009)
	McIlvaine buffer pH 7.0	30 kV/cm; 150 μ s; 24°C	3.6	
	LWE	30 kV/cm; 50 μ s; 24°C	2.0	Monfort et al. (2010)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Juice-milk based	35 kV/cm, 350 μ s	2.0	Sampedro et al. (2011)
	McIlvaine buffer pH 7.0	28 kV/cm, 150 μ s; 24°C	3.2	Álvarez et al. (2003)

by regulatory agencies for food/pathogen combination could be very useful for judging equivalency when a new technology is proposed as an alternative to traditional pasteurization (NACMCF, 2006).

In order to achieve a successful use of PEF as a pasteurization process, it is critical to demonstrate that it is possible to reach the performance criterion in the target microorganisms. The control parameters that must be applied to achieve a performance criterion are referred to as *Process Criterion* (ICMSF, 2002). The description of the kinetics of microbial inactivation and the development of predictive models are very useful tools to define the *Process Criterion* of different processes with a similar inactivation effect to achieve the *Performance Criterion* and to establish the requirements that the PEF equipment must meet to apply the treatment on a commercial scale.

Before describing the kinetics and developing predictive models, it is necessary to define the control parameters that influence the efficacy of the inactivating technology. Electric field strength, treatment time, specific energy, pulse shape, frequency and temperature have been reported to be the main processing parameters that influence the microbial resistance to PEF (Min et al., 2007; Ortega-Rivas, 2011). There is a general agreement in published literature that electric field strength and treatment time are the most important processing parameters that characterize PEF technology.

To induce microbial inactivation, it is necessary to apply an electric field with a strength above a critical value. Microbial inactivation increases by increasing intensity of electric field and treatment time when treatments are applied above the critical value. The specific energy of the PEF treatment depends on the voltage applied, treatment time, and electric resistance of

the treatment chamber, that varies according to the geometry and conductivity of the food. This parameter permits to know the energy cost of the process and to compare the energy requirements of different preservation systems (Heinz, Toepfl & Knorr, 2003). The use of this parameter instead of the treatment time has been proposed as a process criterion because it is difficult to define the treatment time when exponential decay pulses are used (Álvarez, Raso, Sala & Condón, 2003c; Heinz, Álvarez, Angersbach & Knorr, 2001).

There is some controversy concerning the influence of the pulse shape, width, and frequency on PEF microbial inactivation. Presently, it is generally accepted that square wave pulses are better than exponential decay ones. Although some authors have observed a slightly higher inactivation with longer pulses and higher frequencies (Aronsson & Rönnner, 2001; Wouters, Dutreux, Smelt & Lelieveld, 1999), these two parameters apparently exert no influence when the temperature rise of the medium caused by the application of longer pulses of higher frequencies is avoided (Álvarez, Pagán, Condón & Raso, 2003b).

Finally, researchers have observed that microbial inactivation by PEF increases when the treatment temperature raises, even if this temperature is not lethal to microorganisms; however, the method for quantifying the influence of this factor remains unclear, because studies were conducted in continuous systems in which the temperatures changed during the treatment (Amiali, Ngadi, Smith & Raghavan, 2007; Heinz et al., 2003).

The development of a predictive model requires following several steps. The first step is to describe the microbial evolution as a function of time (primary models). Secondary models characterize the parameters

appearing in primary model approaches as a function of process parameters and environmental conditions. Finally, primary and secondary models are combined to predict the microbial evolution as a function of process parameters and environmental conditions.

Some of the first investigations on microbial inactivation by PEF suggested as primary model to describe the survival curves the first-order kinetics (Heinz, Phillips, Zenker, & Knorr, 1999; Martín-Belloso, Qin, Chan, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1997; Reina, Jin, Zhang & Yousef, 1998). However, these linear relationships were observed for short treatment times. When the treatment time is prolonged in order to achieve higher inactivation, the shape of the survival curves is generally concave upward. Along the years, several equations have been proposed for describing these survival curves corresponding to PEF inactivation, being an equation based on the Weibull distribution the most used due to its simplicity and flexibility (Alvarez, Virto,

Raso & Condón, 2003c, Fox, 2007; Rodrigo, Martínez, Harte, Barbosa-Cánovas & Rodrigo, 2001; Sampedro, Rivas, Rodrigo, Martínez & Rodrigo, 2006)

Generally secondary models used to describe the microbial inactivation by PEF are based on quadratic equations which complexity increases with the number of processing variables investigated and the experimental range considered. Recently combination of experimental design techniques with multiple regression analysis and Monte Carlo simulation have been used to establish the most influential factors on the inactivation of pathogenic microorganisms by PEF (Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia & Martín-Belloso, 2007; Sampedro, Rodrigo & Martínez, 2011). As these approaches also generate complex equations, the development of user-friendly software applications could facilitate the employment of mathematical models to design PEF pasteurization treatments by technicians in the food industry.

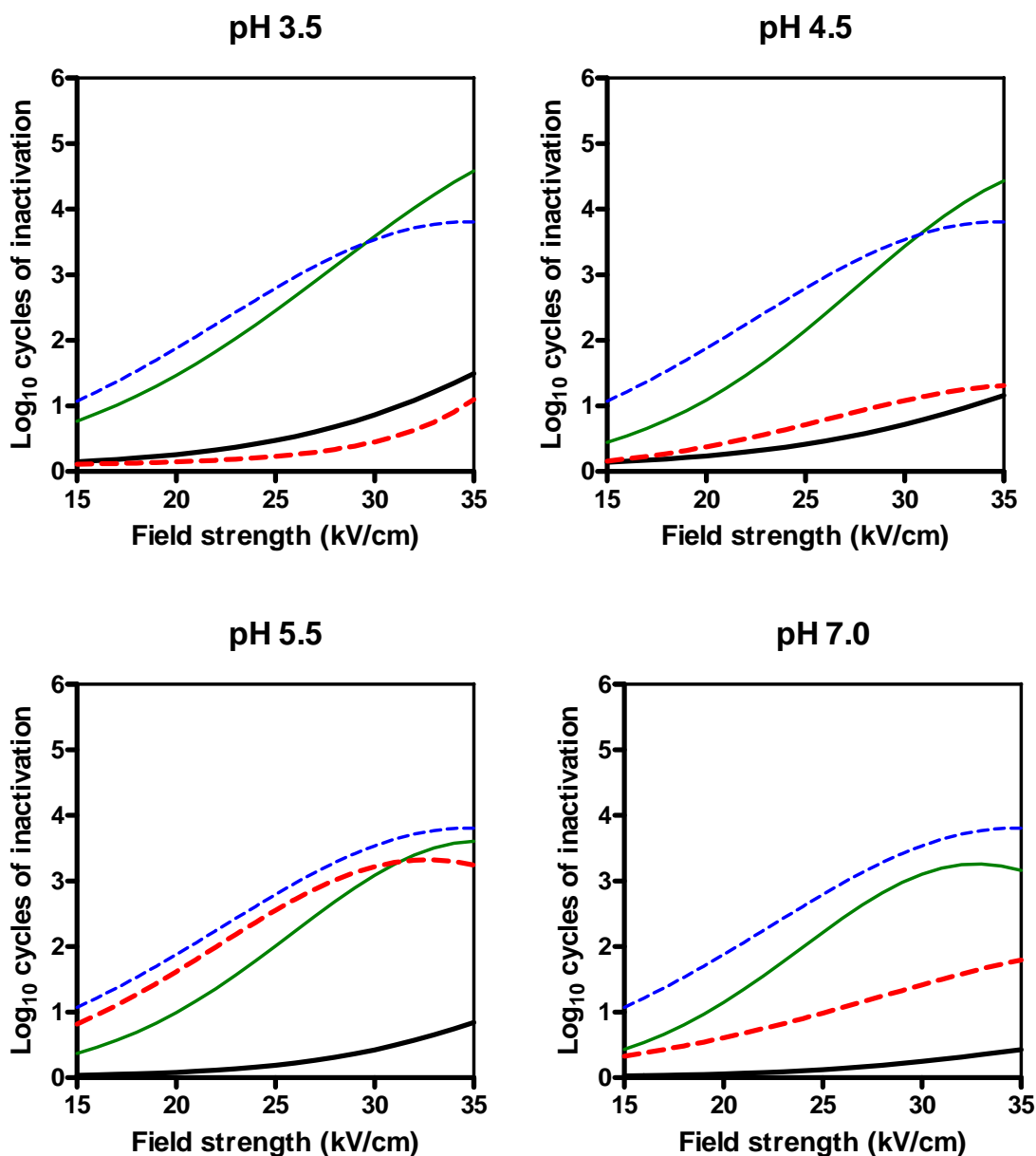


Figure 1. Log_{10} cycles of microbial inactivation by PEF treatments of 100 μs at different field strengths in media of distinct pH estimated by tertiary models. *L. monocytogenes* 5672 (—), *E. coli* O157:H7 (---), *S. aureus* 4459 (—), *Salmonella* Typhimurium 878 (···).

Mathematical models are especially useful when the influence of several factors on the microbial behavior are investigated under a wide range of treatment conditions. However, from a practical point of view, as it will be discussed later on, PEF resistance should be evaluated while considering commercial applicability of the treatments. Generally, studies in which has been reported a PEF inactivation of pathogenic microorganisms higher than 5 Log_{10} cycles have been conducted using long treatment times (Mosqueda-Melgar, Elez-Martínez, Raybaudi-Massilia & Martín-Belloso, 2008). These treatments may not be a feasible application for an industrial-scale continuous process.

Figure 1 compares the resistance of four PEF-resistant pathogenic strains under treatment conditions commercially applicable in media of different pH. The inactivation achieved in the two more resistant strains *-L. monocytogenes* 5672 and *E. coli* O157:H7- (0,5 to 3 Log_{10} cycles) was too low to reach an appropriate level of public health protection. Therefore approaches such as increasing the process temperature or combining PEF with other preservation methods are required to achieve the sufficient microbial destruction required for designing PEF pasteurization processes.

Influence of temperature on microbial inactivation by PEF.

Results reported in the literature show that microbial inactivation by PEF is usually enhanced when the temperature of the treatment medium is increased, even in range to temperatures that are not lethal for microorganisms (Amiali et al., 2007; Fox, Esveld, Mastwijk & Boom, 2008; Sampedro et al., 2006; Sepúlveda, Góngora-Nieto, San-Martín & Barbosa-Cánovas, 2005). This effect has been attributed to changes in the phospholipid bilayer structure of the cell membranes from gel-like to a liquid crystalline state caused by the temperature increase. The increased membrane fluidity reduces its stability and facilitates the electroporation caused by PEF in the cell membrane (Jayaram, Castle & Margaritidis, 1991).

Generally, investigations into the influence of temperature on microbial inactivation by PEF have been performed in continuous flow treatment chambers (Amiali et al., 2007; Heinz et al., 2003; Sepúlveda et al., 2005). In these studies, the outlet temperature was variable and depended on the inlet temperature and temperature increases during the PEF treatment as a result of the thermal energy dissipated in the product due to its resistance to the current flow. While in some cases the treatment conditions were selected in order to keep treatment temperatures below those that have lethal effects on microorganisms, in others inlet temperatures until 70 °C were used (Heinz et al., 2003; Guerrero-Beltrán, Sepúlveda, Góngora-Nieto, Swanson & Barbosa-Cánovas, 2010). These higher inlet temperatures make difficult discriminating thermal effects from PEF effects on microbial inactivation. On the other hand application of numerical simulation techniques have demonstrated that an extensive distribution of temperatures can exist in the treatment chamber during continuous processing due to in-homogeneities in the electric field distribution, especially when co-linear treatment chamber configurations are used (Buckow, Schroeder, Berres,

Baumann & Knoerzer, 2010). So in continuous process it is difficult to know exact process temperature.

In the Novel Q project, in order to obtain a better understanding of the influence of the temperature on PEF microbial inactivation, a static parallel-electrode treatment chamber with tempered electrodes that permitted obtaining data at different temperatures under quasi-isothermal conditions and uniform electric field strength was designed. Using this treatment chamber, Saldaña et al. (2010a) demonstrated that treatment temperature had a very important effect on PEF inactivation. For example, the increment of the temperature from 4 to 50°C increased the inactivation of a PEF treatment (30 kV/cm, 100 μs) from less than 0.5 to 5 Log_{10} cycles reductions the population of *Salmonella* Typhimurium 878.

Results obtained with the designed treatment chamber demonstrated that the microbial inactivation by PEF is highly dependent on the temperature, even when the treatments are applied at temperatures that are not lethal for the microorganisms. Therefore, the temperature during treatment is a critical parameter that should be considered in future studies in order to characterize microbial PEF resistance and to obtain reliable kinetic data to design predictive models.

Combining PEF with other preservation methods in the design of pasteurization processes.

Combining PEF with other preservation methods has been widely investigated with the purpose of increasing the lethal effect of PEF treatments to levels that guarantee food safety. This topic has been recently reviewed by Martín-Belloso and Sobrino-López, (2011). PEF in combination with other physical methods of microbial inactivation based on thermal and nonthermal effects (high hydrostatic pressure, high pressure carbon dioxide, ultrasound, ultraviolet radiation or high intensity light pulses) has proven to be effective in order to enhance microbial inactivation. Generally, the combination of these treatments consisted in a successive application of hurdles but, in some cases, PEF has been applied simultaneously with HHP or moderate temperatures.

Inactivation reported by combining PEF with these other inactivation techniques has proved to cause microbial reductions higher than 5 Log_{10} cycles in different pathogenic microorganisms. However, these combinations have been conducted with PEF treatments of very long duration (high number of pulses) at very high electric field strengths (>30 kV/cm) that limit its applicability at commercial scale. For example, Walkling-Ribeiro et al. (2008) obtained 9.5 Log_{10} reductions in the population of *S aureus* in apple juice by combining a PEF treatment at 40 kV/cm for 100 μs followed by a UV treatment (30 W, 30 min).

Another approach considered to improve microbial lethality has been the combination of PEF with antimicrobials such as bacteriocins (nisin, enterocin AS-48) enzymes (lysozyme), organic acids (citric, lactic, acetic, malic) or essential oils (clove, carvacrol, citral). Several authors reported additive or synergistic effects on microbial inactivation when antimicrobials were added to the treatment medium including buffers and liquid foods (Martín-Belloso & Sobrino-López, 2011). However, it is well known that some antimicrobials used in these combinations such as nisin, or lysozyme are ineffective or scarcely effective against Gram-negative bacteria. For

example, McNamee et al. (2010) found that adding 2.4 IU/ml of nisin to orange juice the PEF (40 kV/cm, 100 μ s) inactivation of *Listeria innocua* increased 1.7 Log₁₀ cycles but of *E. coli* less of 1 Log₁₀ cycle. On the other hand the presence of nisin (200 ppm) in the treatment medium did not increase the lethality of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium 878 (Saldaña, Monfort, Condón, Raso & Álvarez, 2011a), so it seems that the impermeability of the outer membrane of Gram-negative bacteria does not allow nisin to reach its site of action - cytoplasmic membrane- even when the cells are treated by PEF. The lack of synergy between some antimicrobials and PEF to inactivate Gram-negative bacteria makes these combinations an ineffective application for pasteurizing foods in which both Gram-positive and negative microorganisms are present.

A synergistic effect between N^α-lauroyl ethylester (ethyl lauroil arginate, LAE) and PEF was observed for Gram-positive and Gram-negative PEF resistant strains (Saldaña Puértolas, Condón, Álvarez & Raso, 2010b). At temperatures between 40 and 50°C around 5 Log₁₀ cycles of inactivation in the population of *E. coli* O157:H7 were obtained at 30 kV/cm for 100 μ s when LAE was present in the treatment medium at a concentration of 50 ppm. Therefore, the application of PEF in the presence of LAE at moderate temperatures has a great potential for achieving effective control of pathogenic microorganisms.

Continuous PEF treatments for food pasteurization.

Treatments in batch with a static treatment chamber with parallel electrodes permit processing small samples and strictly controlling the treatment conditions (Raso, Álvarez & Condón, 2000). This approach is required in order to get a better understanding of the critical parameters affecting microbial inactivation by PEF, prevent experimental artifacts, and avoid misinterpretation of the results. However, as commercialization of PEF processing for liquid food pasteurization requires the application of continuous flow treatments, results obtained in a batch treatment need to be validated in a continuous flow installation before they can be successfully implemented on a large scale.

Microbial inactivation by PEF in continuous flow treatment has been extensively reported in the literature (Mosqueda-Melgar et al., 2008). However, as most of these studies have not been conducted with target microorganisms of public health concern, *Process Criteria* that demonstrate that it is possible to reach an extensive microbial inactivation in the target microorganisms has not been proposed (El-Hag, Dadarwal, Gonzalez, Jayaram & Griffiths, 2010).

Recently there has been considerable progress in the development of continuous flow treatment chambers that are essential for scaling up the technology for industrial applications (Huang & Wang, 2009). A detailed knowledge of the values of the critical process parameters affecting microbial inactivation inside the treatment chamber during processing is necessary for validation. The small dimensions of the treatment chambers make it impossible to perform adequate measurements of the process parameters inside the treatment chamber with the corresponding probes without perturbation of the flow, temperature, and electric field distribution (Jaeger, Meneses & Knorr, 2009).

Gerlach et al. (2008) reviewed investigations of applying numerical simulation techniques to provide information on the spatial and temporal distribution of the electric field strength and temperature inside the treatment chambers with different electrode configurations. A more uniform treatment can be achieved using a parallel plate electrode configuration than a co-linear configuration (Figure 2). However, for some applications co-linear configuration is selected because the load resistance of the treatment chamber is higher and, as consequence, the energetic requirements are lower. In order to improve the treatment uniformity in co-linear configurations it has been suggested to generate a turbulent flow by modifying the treatment chamber geometry or by inserting a grid before the treatment zone (Jaeger et al., 2009, Buckow, Bauman, Schroeder & Knoerzer, 2011; Meneses, Jaeger, Moritz & Knorr, 2011). Although it has been demonstrated that these approaches produce a more uniform treatment conditions, in-homogeneities in the distribution of the electric field strength and temperature in treatment zone are still observed. As uniform processing of food when passing through the treatment chamber is one of the most important criteria for a successful design in terms of assuring food safety, a parallel electrode treatment chamber would be more appropriate for validating pasteurization treatments.

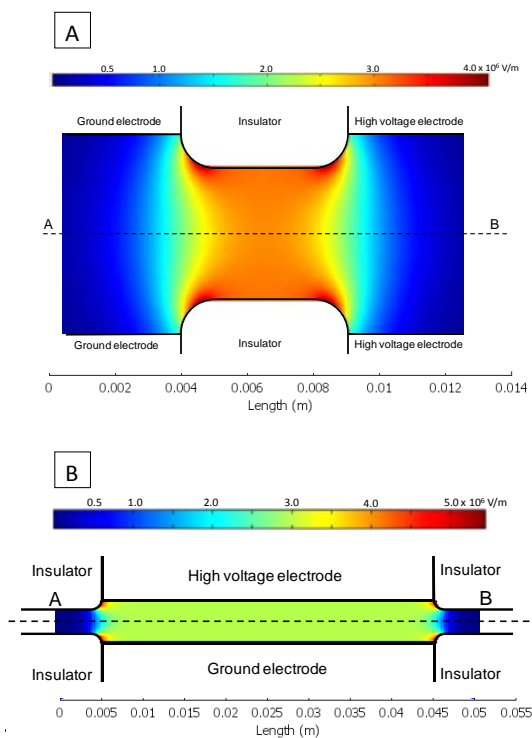


Figure 2. Sectional views of the electrode configuration and the resulting electrical field in the treatment zones of a co-linear (A) and parallel-electrodes (B) treatment chambers, calculated for: 6 mm electrode inner diameter, 4 mm insulator inner diameter, 5 mm gap length, 19.5 kV charging voltage, 2 mS/cm fluid conductivity for the co-linear chamber; and 4 cm electrode length, 5 mm gap length, 15 kV charging voltage, 2 mS/cm fluid conductivity for the parallel-electrode chamber.

Other aspect that needs to be considered to implement the PEF technology by the food industry is that the treatments conditions needed to guarantee food safety should be applicable at commercial scale. Studies to evaluate the application of PEF for microbial decontamination at laboratory scale has been generally conducted with very long treatments ($>100 \mu\text{s}$) at very high electric field strengths ($>30 \text{ kV/cm}$) (Mosqueda-Melgar et al., 2007; Sampedro et al., 2006; Sepulveda et al., 2005; Walkling-Ribeiro, Noci, Cronin, Lyng & Morgan, 2009a; Zhao, Yang, Lu, Wang, Qiang & Yang, 2008). At commercial scale, technical and economical limitations exist for applying these so intense treatments. Long treatments require recirculation or using several treatment chambers and cooling the food between chambers to maintain the temperature below those used in thermal processing (Min, Jin, Min, Yeom & Zhang, 2003). Consequently, in addition of the high total specific energy required in these long treatments an extra cost is necessary for controlling food temperature. On the other hand, technical limitations and risks of arcing exist for applying electric field strength above 30 kV/cm in the treatment chambers required for commercial application of PEF technology (Barbosa-Cánovas & Altunakar, 2006).

Heinz et al. (2003) demonstrated using a parallel electrodes treatment chamber that by modifying the inlet temperature in the range of 35 to 65°C the energy consumption of a PEF treatment (35 kV/cm) required for a reduction of 6 Log_{10} cycles on the population of *E. coli* suspended in apple juice could be reduced from above 100 to less than 40 kJ/kg . Although the increment of the initial temperature of the untreated juice would increase the energetic cost of the PEF process, these authors proposed that the thermal energy dissipated in the product due to its resistance to the current flow during the PEF treatment could be recovered in a heat exchanger for preheating the untreated product. PEF processing at temperatures over 53°C using a thermal regeneration system was also observed that could be an effective treatment for extending the shelf-life of whole milk at low energy-consumption rates (Sepúlveda, Gongora-Nieto, Guerrero & Barbosa-Canovas, 2009).

Saldaña et al. (2011b) following the same strategy, investigated the *Process Criterion* to achieve the *Performance Criterion* established by the FDA to pasteurize apple juice by PEF using a parallel electrode treatment chamber. Target microorganisms used for this study were four PEF resistant strains such as *Listeria monocytogenes* 5672, *Staphylococcus aureus* 4459, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium 878. A treatment of 25 kV/cm for $63 \mu\text{s}$ that correspond with an inlet temperature of 35°C and an outlet temperature of 65°C and an input energy of 125 kJ/kg was required to achieve more than 5 Log_{10} cycles in the four strains. The addition of LAE permitted to reduce the treatment time required to obtain an equivalent inactivation in the four microorganisms to $38.4 \mu\text{s}$, the outlet temperature to 55°C and the input energy to 83.2 kJ/kg . These treatment conditions should be considered in the future during studies on the impact of PEF on shelf-life and quality attributes of foods.

Therefore, the application of PEF at moderate temperatures provides the possibility of obtaining substantial microbial inactivation of pathogenic

microorganisms that are extremely more PEF resistant at lower temperatures than those used in conventional heat treatment with a very short residence time (0.8 second). Combining the PEF treatment at moderate temperatures with the presence of antimicrobials effective against Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria would permit reducing the number of pulses and consequently the energy costs required to obtain safe foods.

Conclusions and future research demands.

PEF is viewed as one of the most promising methods for food pasteurization because of its potential for inactivating microorganisms at temperatures that avoid the harmful effects of heat on the organoleptic properties and the nutrient values of liquid foods. However, before the technology can be commercialized and used for food pasteurization of liquid foods, it is critical to demonstrate that PEF treatments promote an equivalent or, preferably, an enhanced safety level when compared with the commercially available products processed with the conventional technologies.

Results reported in the literature indicated that there was a considerable variation in the susceptibility of different strains of pathogenic microorganisms to PEF treatments. This must be taken into consideration in studies that aim to define process criterion to achieve a given performance criterion. If studies are not conducted with the most PEF-resistant strains selected in previous screening studies, results should be validated with different strains. On the other hand, it has been demonstrated that when operating at room temperature, PEF process conditions that are commercially applicable, are not sufficient to obtain substantial inactivation in the most PEF-resistant strains of pathogenic microorganisms.

The design of a treatment chamber with tempered electrodes that permits to apply uniform electric field strengths at different temperatures at quasi-isothermal conditions has confirmed that microbial inactivation by PEF is highly dependent on the temperature of the treatment medium. Therefore, kinetic studies on microbial inactivation by PEF at different temperatures are required to evaluate the real potential of this technology for food preservation because the incremental lethality of PEF treatments at moderate temperatures introduces the possibility of pasteurizing liquid foods using short treatments at moderate electric field strengths.

The implementation of PEF technology in the food industry as an alternative to food pasteurization requires demonstrating that during the process all parts of the food receive the established treatment to achieve an inactivation level that guarantees food safety. Recently the application of numerical simulation techniques has demonstrated in-homogeneity in the electric field strength and temperature distribution in the treatment chambers during PEF processing in continuous flow. The lack of uniformity in the distribution of the temperature and electric field strength can impair the evaluation of the treatment lethality. An approach to estimating the microbial inactivation in a continuous PEF treatment is to assume that the inactivation in an in-homogeneous PEF process is a function of the momentary electric field strength and temperature in the different zones of the treatment chamber. To validate this approach the integration of numerical simulation techniques in order to

know the distribution of temperature and electric field strength in continuous treatment chambers with the development of predictive models generated from microbial inactivation data obtained under uniform conditions of temperature and electric field strength should be required.

PEF at moderate temperatures and treatments conditions commercially applicable has proven to be effective to obtain substantial inactivation of very PEF-resistant strains in continuous treatments of apple juice. These *Process criteria* should be considered in the future during studies on the impact of PEF on quality attributes of foods.

The objective of food preservation technologies used by the food industry is to control microorganisms once they have contaminated the foods. Since it is estimated that the infection dose of some pathogenic microorganisms is very low (Blackburn & McClure, 2002), the application of treatments, such as PEF, aiming at microbial destruction is of primary importance to produce safe foods. The definitions of performance standards and criteria such as FSO, *Performance Criteria*, and *Process Criteria* for food pasteurization by PEF can contribute to implementing this technology in the food industry as an effective tool to improve food safety and to meet the consumers' demands for freshness and convenience. These definitions must be based on scientifically validated and verifiable data, which must be continuously improved.

Acknowledgements.

G.S. gratefully acknowledges the financial support for his doctoral studies from the Spanish Ministry for Science and Innovation. This investigation has been funded by the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ).

References

- Álvarez, I., Mañas, P., Condón, S., Raso, J. (2003a). Resistance Variation of *Salmonella enterica* Serovars to Pulsed Electric Fields Treatments. *Journal of Food Science*, 68 (7), 2316-2320.
- Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., & Raso, J. (2003b). The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal Food Microbiology*, 87, 87-95.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F.J., & Condón, S., (2003c). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20, 691-700.
- Álvarez, I., Raso, J., Palop, A., & Sala, F. J. (2000). Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 143-146.
- Álvarez, I., Virto, R., Raso, J., & Condón, S., (2003c). Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 195-202.
- Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., & Raghavan, G. S. V. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 79, 689-694.
- Arnoldi, A. (2002). Thermal processing and nutritional quality. In Henry, C. J. K., Chapman, C. (Eds.). *The Nutrition Handbook for Food Processing* (pp. 265-286). Cambridge: Woodhead.
- Aronsson, K., & Rönnér, 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 Emerging Technologies*, 2, 105-112.
- Barbosa-Cánovas, G.V. & Altunakar, B., (2006). Pulsed Electric Fields Processing of Foods: An Overview. In J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 3-21). Springer: Nueva York.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Tapia, M. S., & Cano, M. P. (2005). *Novel Food Processing Technologies*. Boca Raton: Marcel Dekker/CRC Press.
- Blackburn, C., & McClure, P. (2002). Introduction. In Blackburn, C., McClure, P. (Eds.) *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control* (pp. 3-10). Cambridge: Woodhead.
- Buckow, R., Baumann, P., Schroeder, S., & Knoerzer, K., (2011). Effect of dimensions and geometry of co-field and co-linear pulsed electric field treatment chambers on electric field strength and energy utilization. *Journal of Food Engineering*, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.03.019.
- Buckow, R., Schroeder, S., Berres, P., Baumann, P. & Knoerzer, K., (2010). Simulation and evaluation of pilot-scale pulsed electric field (PEF) processing. *Journal of Food Engineering*, 100, 67-77.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2007). Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 304-311.
- da Cruz, A.G., Fonseca Faria, J.D.A., Isay Saad, S.M., André Bolini, H.M., SantAna, A.S., & Cristianini, M.(2010). High pressure processing and pulsed electric fields: Potential use in probiotic dairy foods processing *Trends in Food Science and Technology*, 21, 483-493.
- El-Hag, A.H., Dadarwal, R., Gonzalez, O.R., Jayaram, S.H., Griffiths, M.W. (2010). Survivability of inoculated versus naturally grown bacteria in apple juice under pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 46 (1), 9-15.
- El-Hag, A.H., Jayaram, S.H., Griffiths, M.W., (2006). Inactivation of naturally grown microorganisms in orange juice using pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34 (4 II), 1412-1415.
- Evrendilek, G.A., Jin, Z.T., Ruhlman, K.T., Qiu, X., Zhang, Q.H. and 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 & Emerging Technologies* 1, 77-86.
- Evrendilek, G.A., Li, S., Dantzer, W.R., Zhang, Q.H. (2004). Pulsed electric field processing of beer: microbial, sensory, and quality analyses. *Journal of Food Safety*. 69 (8), 228-232.

- Evrendilek, G.A., & Zhang, Q.H.**, (2005). Effects of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields-induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Engineering* 68 (2), 271-276.
- Food & Drug Administration (FDA)** (2001). Hazard analysis and critical control point (HACCP) procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. *Federal Register*, 66, FR 6137-6202.
- Fox, M.B.**, (2007). Microbial inactivation kinetics of pulsed electric field treatment. In Lelieveld H.L.M., Nontermans S., de Haan S.W.H. (eds.) *Food preservation by pulsed electric field*. CRC Press, New York, pp 127.134
- Fox, M.B., Esveld, D.C., Mastwijk, H., & Boom, R.M.** (2008). Inactivation of *L. plantarum* in a PEF microreactor. The effect of pulse width and temperature on the inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 101-108.
- García, D., Gómez, N., Raso, J., & Pagán, R.** (2005). Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 388-395.
- Gerlach, D., Alleborn, N., Baars, A., Delgado, A., Moritz, J., & Knorr, D.** (2008). Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 408-417.
- Guerrero-Beltrán, J.A., Sepúlveda, D.R., Góngora-Nieto, M.M., Swanson, B., & Barbosa-Cánovas, G.V.**, (2010). Milk Thermization by pulsed electric fields (PEF) and electrically induced heat. *Journal of Food Engineering*, 100 (1), 56-60.
- Gurtler, J.B., Rivera, R.B., Zhang, H.Q., Geveke, D.J.**, (2010) Selection of surrogate bacteria in place of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for pulsed electric field treatment of orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 1-8.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A., & Knorr, D.** (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – Basic concepts for process design. *Trends Food Science and Technology*, 12, 103-111.
- Heinz, V., Phillips, S.T., Zenker, M., & Knorr, D.**, (1999). Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. *Food Biotechnology* 13, 155-168.
- Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D.** (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 165-175.
- Huang, K., & Wang, J.** (2009). Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering*, 95, 227-239.
- IFT.** 2004. Managing Food safety: Use of performance standards and other criteria in food inspection systems. A Report of the Institute of Food Technologist. Chicago.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)** (2002). *Microorganism in foods. Microbial testing in food safety management*. New York:Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Jaeger, H., Meneses, N., & Knorr, D.** (2009). Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 470-480.
- Jayaram, S., Castle, G. S. P., & Margaritidis, A.** (1991), Effects of high electric field pulses on *Lactobacillus brevis* at elevated temperatures, *IEEE Industrial Applied Society Meeting*, 674-681.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E.** (2003). Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field processing optimization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2223-2229.
- 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. *Journal of Food Process Engineering* 20, 317-336.
- Martín-Belloso, O., Sobrino-López, A.**, (2011). Combination of Pulsed Electric Fields with Other Preservation Techniques. *Food and Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-011-0512-z.
- McNamee, C., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J., 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., Moritz, J. & Knorr, D.**, (2011). Impact of insulator shape, flow rate and electrical parameters on inactivation of *E. coli* using a continuous co-linear PEF system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12 (1), 6-12.
- Metrick, C., Hoover, D. G., & Farkas, D. F.** (1989). Effect of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54, 1547-1564.
- Min, S., Evrendilek, G.A. & Zhang, H.Q.** (2007). Pulsed electric fields: Processing system, microbial and enzyme inhibition, and shelf life extension of foods. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 35, 59-73.
- Min, S., Jin, Z.T., Min, S.K., Yeom, H. & Zhang, Q.H.**, (2003). Commercial-Scale Pulsed Electric Field Processing of Orange Juice. *Journal Of Food Science* 68 (4), 1265-1271.
- Monfort, S., Gayán, E., Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J. and Álvarez, I.**, (2010). Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields in liquid whole egg. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 306-313.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R.M., & Martín-Belloso, O.** (2008). Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 747-759.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., & Martín-Belloso, O.**, (2007). Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella* Enteritidis,

- Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 117, 192-200.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)** (2006). Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection*, 69, 1190-1216.
- Ortega-Rivas, O.**, (2011). Critical Issues Pertaining to Application of Pulsed Electric Fields in Microbial Control and Quality of Processed Fruit Juices. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (4), 631-645.
- 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 Science and Technology International*, 4, 33-44.
- Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F.** (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S29-S42.
- Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V.** (2003). Non-thermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 43, 265-85.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., & Sala, F. J.** (2000). Predicting inactivation of *Salmonella* Senftenberg by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 21-30.
- Reina, L.D., Jin, Z.T., Zhang, Q.H., & Yousef, A.E.**, (1998). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 61, 1203-1206.
- 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 kinetics models. *Journal of Food Protection* 64 (2), 259-263.
- Rodríguez-Calleja, J.M., Cebrián, G., Condón, S., Mañas, P.** (2006). Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (5), 1054-1062.
- Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, 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, 160-165.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., & Raso, J.** (2010a). Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering*, 100, 349-356.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. & Raso, J.** (2010b). Liquid Food Pasteurisation by Pulsed Electric Fields. Berlin Food 2010, European PhD conference in Food Science and Technology. Berlin, Germany.
- Saldaña, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J. & Álvarez, I.** (2011a) Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Research International*. Submitted.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Monfort, S., Raso, J., & Álvarez, I.**, (2011b). Defining Treatment Conditions for PEF Pasteurization of Apple Juice. *International Journal of Food Microbiology*. Submitted.
- 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.
- 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.
- Saulis, G.**, (2010). Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Engineering Review*, 2, 52-73.
- Sepúlveda, D.R., Góngora-Nieto, M.M., Guerrero, J.A. & Barbosa-Cánovas, G.V.**, (2009). Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (3), 735-739.
- Sepúlveda, D.R., Góngora-Nieto, M.M., San-Martín, M.F., & Barbosa-Cánovas, G.V.**, (2005). Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 38, 167-172.
- Sobrino-Lopez, A. & Martín-Belloso, O.**, (2006). Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection* 69, 345-353.
- Ukuku, D., Yuk, H.G. & Zhang, H.** (2010). Behavior of Pulsed Electric Fields Injured *Escherichia coli* O157:H7 Cells in Apple Juice Amended with Pyruvate and Catalase. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. DOI:10.4172/1948-5948.1000038
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G. & Morgan, D.J.**, (2009a). Antimicrobial effect and shelf-life extension by combined thermal and pulsed electric field treatment of milk, *Journal of Applied Microbiology*, 106, 241-248.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Riener, J., Lyng, J.G., Morgan, D.J.**, (2008). Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 89 (3), pp. 267-273.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Riener, J., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J.** (2009b). The Impact of Thermosonication and Pulsed Electric Fields on *Staphylococcus aureus* Inactivation and Selected Quality Parameters in Orange Juice. *Food Bioprocess Technology*, 2, 422-430.
- 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, 5364–5371.

Zhao, W., Yang, R., Lu, R., Wang, M., Qian, P. & Yang, W., (2008). Effect of PEF on microbial inactivation and physical–chemical properties of green tea extracts, *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 425–431.

Manuscrito VIII

Submitted

Defining Treatment Conditions for PEF Pasteurization of Apple Juice.

Saldaña G, Puértolas E, Monfort S, Raso J, Álvarez I*.

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain.

ABSTRACT

The influence of temperature and the presence of N^o-lauroyl ethylester (ethyl lauroil arginate, LAE) on the inactivation caused by continuous PEF treatments in *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice have been investigated to define treatment conditions applicable at industrial scale that promote an equivalent safety level when compared with conventional technologies. In the range of experimental conditions investigated at outlet temperatures equal or lower than 55±1°C, the inactivation of *E. coli* O157:H7 treated in apple juice ranged from 0.4 to 3.6 Log₁₀ cycles reduction and treated in apple juice supplemented with LAE (50 ppm) ranged from 0.9 to 6.7 Log₁₀ cycles reduction.

An empirical mathematical model was developed to estimate the treatment time and total specific energy input to obtain 5 Log₁₀ cycles reduction in the population of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice supplemented with 50 ppm of LAE at different electric field strengths and inlet temperatures. Treatment conditions established for *E. coli* O157:H7 were validated with other PEF resistant Gram-positive and Gram-negative strains, such as *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *S. aureus*. When the treatment was applied to the apple juice, a treatment of 25 kV/cm for 63 µs corresponding with an outlet temperature of 65°C and input energy of 125 kJ/kg was required to achieve more than 5 Log₁₀ cycles in the four strains of pathogenic microorganism investigated. The addition of LAE reduced the treatment time required to obtain an equivalent inactivation in the four microorganisms to 38.4 µs, the outlet temperature to 55°C, and the input energy to 83.2 kJ/kg.

INTRODUCTION

The introduction of innovative preservation technologies for extending food shelf-life and enhancing microbial food safety without compromising the nutritional and sensory characteristics of foods and with a reduction of energetic costs is one of the strategies that may lead to improve the competitiveness of the food industry (Rajkovic, Smigic & Devlieghere, 2010). Different technologies that allow killing microorganisms at temperatures below those used in thermal processing have been proposed to achieve this objective. High hydrostatic pressure (HHP) and pulsed electric field (PEF) are the most investigated (Toepfl, Mathys, Heinz & Knorr, 2006). Presently, different companies commercialize foods processed by HHP, but PEF technology has not been implemented by the food industry until now (Tonello, 2011).

The main advantage of PEF compared with HHP is the possibility of processing liquid foods in continuous flow in a few seconds. In the last years, different liquid foods has been treated with both laboratory and pilot plant scale continuous flow PEF systems to evaluate the impact of PEF treatments on microbial inactivation, physicochemical and nutritional properties of foods, and food shelf-life (Min, Jin, Min, Yeom & Zhang, 2003; Cortés, Esteve & Frigola, 2008; Aguiló-Aguayo, Soliva-Fortuny & Martín-Belloso, 2008). The main limitation of these investigations is that the criteria used to establish the applied PEF treatment conditions (electric field strength, treatment time, etc.) were arbitrary and did not demonstrate if these treatments were enough to guarantee food safety. As bacterial spores are resistant to PEF treatments, the main application of PEF technology for food preservation must be focused on pasteurization. The objective of pasteurization is to minimize any possible health hazards arising from pathogenic microorganisms to a level that is not likely to represent a public health risk under normal conditions of distribution and storage (NACMCF, 2006).

The traditional pasteurization process in the food industry is based on thermal processing. To replace these treatments by PEF, treatment conditions used for evaluating the potential applications of this technology should not only improve food quality but should also promote an equivalent microbial safety, as compared with traditional processing. Another aspect for consideration to implement the PEF technology by the food industry is that the treatment conditions needed to guarantee food safety should be applicable at commercial

scale.

Generally, studies to evaluate the application of PEF for microbial decontamination at laboratory scale has been conducted with very long treatments (>100 µs) at very high electric field strengths (>30 kV/cm) (Sepulveda, Góngora-Nieto, San-Martín & Barbosa-Cánovas, 2005; Sampredo, Rivas, Rodrigo, Martínez & Rodrigo, 2006; Mosqueda-Melgar, Raybaudy-Massilia & Martín-Belloso, 2007; Zhao et al., 2008; Walkling-Ribeiro, Noci, Cronin, Lyng & Morgan, 2009). At commercial scale, technical and economical limitations exist in applying these intense treatments. Long treatments require using several treatment chambers and cooling the food between chambers to maintain the temperature below those used in thermal processing (Min et al., 2003). Consequently, in addition to the high total specific energy required in these long treatments, an extra cost is necessary for controlling food temperature. On the other hand, technical limitations and risks of arcing exist for applying electric field strength above 30 kV/cm in the treatment chambers required for commercial application of PEF technology (Barbosa-Cánovas & Altunakar, 2006).

Recently, it has been observed that when operating at room temperature, PEF process conditions that would be commercially applicable (30 kV/cm, 100 µs) are not sufficient to obtain substantial inactivation in several PEF-resistant strains of pathogenic microorganisms in the pH range between 3.5 and 7.0 (Saldaña, Puértolas, Condón, Álvarez & Raso, 2010a). The higher inactivation achieved in the population of the more sensitive strains (*Salmonella* Typhimurium 878 and *Staphylococcus aureus* 4459) was around 3 Log₁₀ cycles. But in the case of *L. monocytogenes* 5672 and *E. coli* O157:H7, the inactivation reached was generally less than 1 Log₁₀ cycles.

An approach to increase the lethal effect of PEF with short treatment times at moderate electric field strengths involves combining this technology with other preservation factors (Raso & Barbosa-Cánovas, 2003). The temperature and the presence of antimicrobials are two factors that influence microbial inactivation by PEF (Wouters, Álvarez & Raso, 2001). Generally, a temperature elevation above room temperature causes a greater level of microbial inactivation, even at temperatures that are not lethal for the microorganism (Heinz, Toepfl & Knorr, 2003; Sepúlveda et al., 2005; Saldaña et al., 2010b). The presence of naturally occurring

antimicrobials such as nisin has been proven effective in increasing the lethality of PEF (Terebiznik, Jagus, Cerruti, de Huergo & Pilosof, 2000; Liang, Mittal & Griffiths, 2002; Gallo, Pilosof, & Jagus, 2007). There is a synergistic effect in the inactivation of Gram-positive bacteria when PEF treatments are combined with nisin, but in some Gram-negative microorganisms, this combination is ineffective (Calderón-Miranda, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1999; McNamee et al., 2010). In foods, both Gram-positive and Gram-negative microorganisms are generally present, but the design of an effective pasteurization process by combining PEF with an antimicrobial requires searching for antimicrobials effective against both groups of bacteria. Cationic surfactant N° -lauroyl ethylester (ethyl lauroil arginate, LAE) wields a wide spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, and moulds (Rodríguez, Seguer, Rocabayera & Manresa, 2004).

Escherichia coli O157:H7 is a foodborne pathogen generally associated with consumption of animal based foods such as milk or ground beef. However, this microorganism can survive the low pH of fruit juices and different acid foods, such as apple juice, which has been implicated in outbreaks (Bull, Szabo, Cole & Stewart, 2005).

This paper investigates the effects of temperature and the presence of LAE on the inactivation caused by continuous PEF treatments in *E. coli* O157:H7, an especially PEF resistant strain, suspended in apple juice. The objective of this study is to define treatment conditions applicable at industrial scale that promote an equivalent safety level when compared with the commercially available products processed with conventional technologies. Treatment conditions established for *E. coli* O157:H7 have been validated with other PEF resistant Gram-positive and Gram-negative strains such as *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *S. aureus*.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and Growth Conditions

The strain of *Escherichia coli* O157:H7 used in this investigation is a VTEC- (Phage type 34) isolated by Dr. Chapman (Chapman et al., 1993). In a previous study, it was demonstrated that this strain was especially resistant to PEF (Saldaña et al., 2009). Subcultures were prepared by inoculating 5 mL tryptic soy broth (Biolife, Milan, Italy) plus 0.6 % (w/v) of yeast extract (Biolife) (TSBYE) with a single colony and incubated for 18 h at 37 °C. This subculture was used to inoculate flasks containing 50 mL of pre-warmed TSBYE to a final concentration of approximately 10^6 CFU/mL. The culture was incubated under agitation (200 rpm) at 37 °C for 24 h until the stationary growth phase was reached (Saldaña et al., 2009). Cell suspensions of *S. aureus* 4459, *L. monocytogenes* 5672, and *Salmonella* Typhimurium 878 were prepared as described by Saldaña et al. (2009).

PEF Treatments

The PEF unit used in this investigation was previously described by Saldaña et al. (2010a, b). The apparatus generates square waveform pulses of a width of 3 μ s. Preliminary studies to investigate the efficacy of the presence of LAE on the inactivation of *E. coli* O157:H7 by PEF at different temperatures were conducted using a batch parallel electrode treatment chamber with tempered electrodes (Saldaña et al., 2010b). This chamber consists of a cylindrical polypropylene tube closed with two polished stainless steel cylinders of 2.01 cm² in surface area and 4 cm in length. The distance between electrodes was 0.25 cm and the volume of the treatment zone was 0.5 mL.

Experimental setup for continuous PEF treatments consisted of a reservoir, a pump, a heat exchanger, and a

treatment chamber. An eight-roll peristaltic pump (Ismatec, Glattbrugg, Switzerland) was used to pump the apple juice from the reservoir through silicone tubes to a coiled metal tube (O_{in} 2 mm, O_{out} 3mm, 230 cm length) immersed into a heating bath and the treatment chamber. The treatment chamber consisted of two parallel stainless steel electrodes with a gap of 4.5 mm and an electrode area of 1.47 cm². Considering the influence of the temperature on apple juice conductivity, the load resistance of the treatment chamber ranged from 100 Ω at 25 °C to 87 Ω at 60 °C. The flow rate was set at 3 L/h, and the calculated mean residence time was 10 and 0.8 s in the heat exchanger and the treatment chamber, respectively. The time elapsed between the exit of the chamber and the taking of the sample in Eppendorf cups immediately placed on ice was 5 s. Temperature of the apple juice was measured with thermocouples located before and after the heat exchanger and just after the PEF treatment chamber.

The specific energy input (W) per pulse expressed in kJ/kg was calculated by the following equation (Eq. 1):

$$W = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} V \cdot I \cdot dt$$

where m (kg) is the mass of the apple juice contained in the volume of the treatment chamber; V is the input voltage (kV); I is the current intensity (A); and t is the treatment time (μ s). The total specific energy was calculated by multiplying the total energy input per pulse by the number of pulses.

Microbial Inactivation Experiments in Batch

Before treatments, microorganisms were centrifuged at 6,000 x g for 5 min at 4 °C and re-suspended in a citrate-phosphate McIlvaine buffer of an electrical conductivity of 0.10 ± 0.01 S/m and pH 3.5. LAE (Lamirsa, SA, Terrasa, Spain) was added to the corresponding media to obtain a concentration of 25 or 50 μ g/mL. The microbial suspension (0.5 mL) at a concentration of approximately 10^8 CFU/mL was placed into the treatment chamber with a sterile syringe.

Microbial Inactivation Experiments in Continuous Treatments

Before treatments, microorganisms were centrifuged at 6,000 x g for 5 min at 4 °C and re-suspended in commercial apple juice (Auchan, Alcampo S.A., Spain) of an electrical conductivity of 0.27 ± 0.02 S/m and pH 3.5 ± 0.1 . LAE at a concentration of 50 ppm was added to the apple juice contaminated with microorganisms in those experiments in which the influence of this compound on the efficacy of PEF was investigated. The influence of electric field strength, treatment time, and initial treatment temperature were investigated. Electric field strength was set at 20, 25, and 30 kV/cm; the treatment time was set between 6 and 123 μ s by varying the frequency of the treatment in the range between 1 and 52 Hz. The initial treatment temperature was set at 20, 30 and 40 °C by adjusting the temperature of the heating bath and the outlet temperature after the PEF treatment ranged between 25 and 60 ± 1 °C.

Enumeration of Viable Cells

PEF treated cell suspensions were serially diluted in 0.1 % sterile peptone solution (Biolife). The medium used for enumeration of viable cells of all strains was Tryptic Soy Agar (Biolife) plus 0.6 % (w/v) of Yeast Extract (Biolife) (TSAYE), with a pH of 6.8 ± 0.1 . From the selected dilutions, 0.1 mL was pour plated into TSAYE, and then plates were incubated at 37 °C for 48 h to detect viable cells.

Statistical Analysis

To determine the influence of electric field strength, treatment time, initial temperature, and total specific energy on microbial inactivation, the results obtained were analyzed by multiple regression starting from a second-order polynomial model using the software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, USA). A backward regression procedure was used to determine the parameters of the models. This procedure systematically removes the effects that were not significantly associated ($P > 0.05$) with the response until a model with only a significant effect was obtained.

RESULTS

Inactivation of *E. coli* O157:H7 by PEF in the Presence of LAE at Different Temperatures in Batch

To evaluate the efficacy of LAE on increasing the lethality of PEF in *E. coli* O157:H7, a preliminary study was conducted in a batch treatment chamber. The inactivation of *E. coli* O157:H7 by PEF (30 kV/cm, 100 μ s) at different temperatures in the presence of 25 and 50 ppm of LAE in media of pH 3.5 is shown in Figure 1. PEF caused a small inactivation at 4 °C even in presence of LAE. PEF inactivation of *E. coli* O157:H7 progressively increased with treatment temperature and LAE concentration. When the treatment was performed at 50 °C, the presence of LAE at 25 and 50 ppm increased the PEF inactivation by around 0.5 and 2 Log_{10} cycles, respectively. The raising of the treatment temperature to 50 °C in the presence of LAE (50 ppm) increased the inactivation caused by PEF around 5 Log_{10} cycles as compared with the PEF inactivation obtained around room temperature (27 °C) in the absence of LAE.

These results show that LAE is an effective antimicrobial to increase the lethality of PEF in a Gram-negative microorganism such as *E. coli* O157:H7. A LAE concentration of 50 ppm was used in studies conducted on the influence of this compound on microbial inactivation by PEF.

Inactivation of *E. coli* O157:H7 by Continuous PEF Treatments in the Presence of LAE at Different Temperatures

The Log_{10} cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 caused by continuous PEF treatments of different electric field strength and duration at different initial temperatures in apple juice and in apple juice added with 50 ppm of LAE are shown in Tables 1 and 2, respectively. Output temperatures for each applied treatment are also shown in the tables being the highest outlet temperature 55 ± 1 °C. As a consequence of the efficacy of LAE on the increment of the lethality of PEF, the highest inlet temperature investigated when this compound was added to the apple juice was 35 °C. Both in the absence or presence of LAE, microbial inactivation tended to increase by increasing inlet temperature, electric field strength, and treatment time. The inactivation of *E. coli* O157:H7 treated in apple juice ranged from 0.4 to 3.6 Log_{10} cycles reduction. However, when LAE was added to the apple juice, a notable increment on the lethal effect of the PEF treatments was observed, ranging the inactivation from 0.9 to 6.7 Log_{10} cycles reduction.

Mathematical Modeling

The application of the multiple regression analysis to the experimental data presented in Tables 1 and 2 resulted in two second-order polynomial equations, whose coefficients are given in Table 3. For the model that describes inactivation of

E. coli O157:H7 in apple juice, the backward regression procedure eliminated the quadratic terms of electric field strength and initial temperature while when LAE was added, the electric field strength and the quadratic term of treatment time were eliminated.

Table 3 also summarizes the statistics used to test the adequacy of the model. The P-values for both models were less than 0.05, which indicates that the model is significant and therefore the terms in the models have a significant effect on the responses. The determination coefficient for each model was higher than 0.90, which means that less than 10 % of the total response variation remained unexplained by the models developed. The adjusted R^2 values that correct the R^2 according to the number of responses and terms in the model were very similar to the corresponding R^2 for both models. The values of the RMSE parameter show that both models produce predictions close to the observed data. The values of the F-test indicate that the predicted and observed values for both models are not significantly different. In both models, the bias factor (B_f) was close to 1, which means that both models are good predictors of the *E. coli* O157:H7 inactivation. The accuracy factors (A_f) show that the predictions differ from the observations by 25 % for the model without LAE and 18 % for the model with LAE.

Figures 2 and 3 illustrate the influence of the factors investigated on the inactivation of *E. coli* O157:H7 by PEF. The graphical representations were obtained using the corresponding regression models for each microorganism (Eq. 2 and 3) considering the responses that were within the range of experimental conditions assayed.

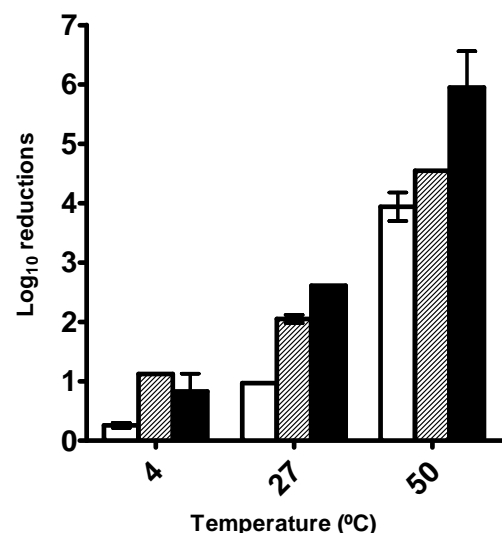


Figure 1: Influence of the presence of LAE on the inactivation of *E. coli* O157:H7 by PEF (30 kV/cm, 100 μ s) at different temperatures (4, 27 and 50 °C). Treatment medium was McIlvaine buffer (white bars), supplemented with 25 ppm of LAE (stripped bars) or 50 ppm of LAE (black bars).

Table 1: Log₁₀ cycles reduction of the population of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice after the application of PEF treatments in continuous flow at different electric field strengths, initial temperatures and treatment times.

T_{in} (°C)	E (kV/cm)	t (μs)	T_{out} (°C)	$Log_{10}(\pm SD)$
20.00	20.00	18.9	24.35	-0.40 ±0.27
20.00	20.00	39.3	29.15	-0.62 ±0.31
20.00	20.00	76.1	39.65	-1.26 ±0.23
20.00	20.00	111.8	50.30	-2.76 ±0.18
20.00	20.00	123.7	54.40	-3.10 ±0.11
20.00	25.00	11.9	25.35	-0.57 ±0.30
20.00	25.00	23.8	29.10	-0.69 ±0.26
20.00	25.00	47.6	39.10	-1.39 ±0.01
20.00	25.00	70.2	50.50	-2.99 ±0.05
20.00	25.00	79.5	56.15	-3.49 ±0.13
20.00	30.00	7.7	25.45	-0.60 ±0.47
20.00	30.00	17.3	29.40	-0.88 ±0.26
20.00	30.00	34.6	39.85	-1.85 ±0.09
20.00	30.00	48.8	51.05	-3.54 ±0.35
20.00	30.00	54.4	54.50	-3.60 ±0.14
30.00	20.00	18.9	35.35	-0.43 ±0.06
30.00	20.00	32.7	39.85	-0.83 ±0.38
30.00	20.00	65.4	51.00	-2.29 ±0.48
30.00	20.00	78.5	55.75	-2.88 ±0.31
30.00	25.00	9.5	35.15	-0.48 ±0.08
30.00	25.00	20.2	39.20	-0.97 ±0.25
30.00	25.00	40.5	50.70	-2.34 ±0.59
30.00	25.00	50.0	56.05	-3.08 ±0.09
30.00	30.00	6.5	35.95	-0.55 ±0.17
30.00	30.00	14.3	39.90	-1.28 ±0.17
30.00	30.00	28.6	49.85	-2.69 ±0.50
30.00	30.00	34.5	55.20	-3.30 ±0.21
40.00	20.00	19.0	44.05	-0.91 ±0.05
40.00	20.00	38.1	50.40	-2.08 ±0.17
40.00	20.00	57.1	54.50	-2.77 ±0.33
40.00	25.00	11.9	45.00	-0.81 ±0.32
40.00	25.00	23.8	50.05	-1.90 ±0.14
40.00	25.00	35.7	55.95	-3.06 ±0.15
40.00	30.00	7.1	44.25	-0.73 ±0.30
40.00	30.00	15.5	50.05	-2.11 ±0.64
40.00	30.00	22.6	55.00	-2.88 ±0.35

T_{in} : initial temperature; E : electric field strength; t : treatment time; T_{out} : outlet temperature; $Log_{10}\pm SD$: Log₁₀ inactivation ± standard deviation.

Table 2: Log₁₀ cycles reduction of the population of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice supplemented with 50 ppm of LAE after the application of PEF treatments in continuous flow at different electric field strengths, initial temperatures and treatment times.

T_{in} (°C)	E (kV/cm)	t (μs)	T_{out} (°C)	$Log_{10}(\pm SD)$
20.00	20.00	38.1	29.00	-1.05 ±0.12
20.00	20.00	78.5	40.30	-2.55 ±0.21
20.00	20.00	104.7	50.60	-4.36 ±0.06
20.00	20.00	117.8	55.15	-5.53 ±0.05
20.00	25.00	22.6	29.65	-1.36 ±0.39
20.00	25.00	46.4	39.90	-3.20 ±0.07
20.00	25.00	67.8	50.45	-5.05 ±0.17
20.00	25.00	78.5	56.00	-5.96 ±0.76
20.00	30.00	14.3	29.85	-1.39 ±0.17
20.00	30.00	33.3	40.80	-3.67 ±0.33
20.00	30.00	44.0	49.90	-5.10 ±0.15
20.00	30.00	51.2	55.00	-5.85 ±0.21
30.00	20.00	21.4	35.00	-1.94 ±0.12
30.00	20.00	42.8	40.70	-3.42 ±0.15
30.00	20.00	71.4	49.75	-4.44 ±0.13
30.00	20.00	89.2	55.95	-5.83 ±0.13
30.00	25.00	10.7	35.15	-2.19 ±0.16
30.00	25.00	25.0	40.40	-3.95 ±0.30
30.00	25.00	47.6	50.95	-6.67 ±0.36
30.00	25.00	54.7	55.10	-7.52 ±0.06
30.00	30.00	8.9	35.35	-1.67 ±0.30
30.00	30.00	17.8	40.05	-2.91 ±0.22
30.00	30.00	34.5	51.00	-5.06 ±0.53
30.00	30.00	40.5	55.60	-5.87 ±0.21
35.00	20.00	7.1	37.20	-1.16 ±0.02
35.00	20.00	16.7	39.80	-1.76 ±0.05
35.00	20.00	27.4	42.80	-2.59 ±0.02
35.00	20.00	34.5	44.95	-3.65 ±0.24
35.00	20.00	50.0	50.25	-5.25 ±0.54
35.00	25.00	4.8	38.10	-0.96 ±0.26
35.00	25.00	9.5	39.60	-1.97 ±0.24
35.00	25.00	16.7	42.75	-3.28 ±0.18
35.00	25.00	23.8	45.15	-4.64 ±0.42
35.00	25.00	35.7	50.15	-6.13 ±0.30
35.00	30.00	3.6	37.35	-0.99 ±0.14
35.00	30.00	8.3	39.85	-2.24 ±0.04
35.00	30.00	13.1	42.95	-3.95 ±0.08
35.00	30.00	16.7	45.10	-4.48 ±0.60
35.00	30.00	26.2	51.50	-6.94 ±0.07

T_{in} : initial temperature; E : electric field strength; t : treatment time; T_{out} : outlet temperature; $Log_{10}\pm SD$: Log₁₀ inactivation ± standard deviation.

Figure 2 shows the effect of the electric field strength and initial treatment temperature on the PEF inactivation of *E. coli* O157:H7 at different treatment times in apple juice without LAE. Increasing initial treatment temperature and electric field strength led to a reduction of the treatment time required to obtain a given reduction in the microbial population. For example, the increment of the initial treatment temperature from 20 to 40 °C reduced the treatment time to obtain an inactivation of 3 Log₁₀ cycles from 117 to 50 μs at 20 kV/cm. On the other hand, the increment of the electric field strength from 20 to 30 kV reduced the treatment time to obtain the same inactivation from 78 to 30 μs when the initial treatment temperature was 30 °C. Increasing both initial treatment temperature and electric field strength resulted in a reduction in the total specific energy required to obtain a given level of inactivation. For example, a reduction of 3 Log₁₀ cycles required a specific energy input of 145 kJ/kg at 20 kV/cm when the initial treatment temperature was 20 °C, but at 30 kV/cm with an initial treatment temperature of 40 °C, around 63 kJ/kg were required.

The influence of the presence of LAE (50 ppm) on the *E. coli* O157:H7 inactivation by a PEF treatment of 25 kV/cm at different initial treatment temperatures and treatment times is shown in Figure 3. The addition of LAE to the apple juice reduced the treatment time, and as a consequence, the specific energy input required obtaining a given level of microbial inactivation at different initial treatment temperatures. For example, when the initial treatment temperature was 30 °C, treatment time to obtain 3 Log₁₀ cycles reduction in the population of *E. coli* O157:H7 decreased from 47 to 23 μs, and specific energy input from 108 to 31 kJ/kg when LAE was added to the apple juice. While in the apple juice the maximum inactivation obtained ranged between 3 and 4 Log₁₀ cycles in the range of conditions investigated, when LAE was added, similar treatments led to an inactivation of around of 6 Log₁₀ cycles reduction or even higher.

Figures 4 A and B show the estimated treatment time and specific energy input to obtain the required 5 Log₁₀ cycles reduction, recommended by FDA guidelines for juice pasteurization (HHS, FDA, 2001), in *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice added with LAE as function of the electric field strength and treatment temperature. The increment of the electric field strength or initial treatment temperature reduced appreciably the treatment time required to obtain the 5 Log₁₀ reductions (Figure 4A). However, at any initial treatment temperature, the increment of the electric field in the range of 20 to 25 kV/cm was more effective in reducing treatment time than at electric field strengths over 25 kV/cm. On the other hand, the initial treatment temperature had a significant influence on the specific energy input of the treatments required to obtain the 5 Log₁₀ reductions (Figure 4B). At low treatment temperatures, the increment of the electric field strength until around 25 kV/cm produced a reduction in the energy consumption, but at temperatures higher than 30 °C, the electric field strength did not affect the energy consumption in the range of 20 to 30 kV/cm. The lowest energy input required to achieve the 5 Log₁₀ reductions in *E. coli* O157:H7 was 60 kJ/kg with the initial treatment temperature at 35 °C. This energy consumption requires the application of a treatment time of around 50 μs if the treatment is applied at the lowest electric field strength (20 kV/cm) and around 20 μs if the treatment is applied at the highest electric field strength (30 kV/cm). Representations of Figure 4 are useful to define the most suitable processing options considering the PEF equipment available and the cost analysis of the process.

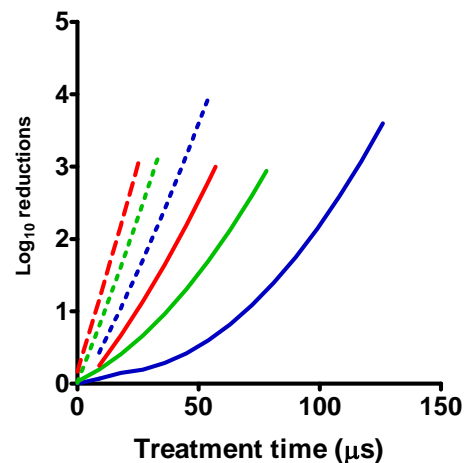


Figure 2: Influence of the electric field strength and initial treatment temperature on PEF inactivation of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice. Data were estimated from equation 2. Treatment conditions: Electric field strengths 20 kV/cm (continuous lines) and 30 kV/cm (dotted lines); initial temperatures 20°C (blue), 30°C (green) and 40°C (red).

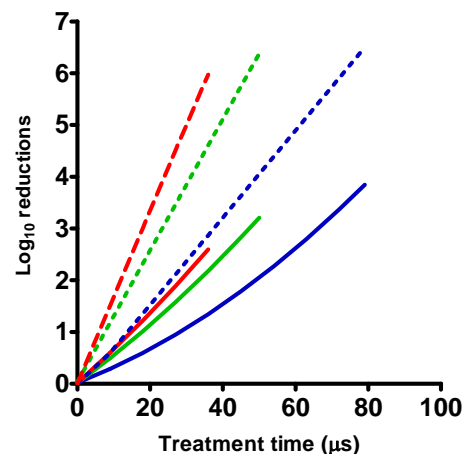


Figure 3: Influence of the presence of LAE (50 ppm) on the inactivation of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice by PEF at different initial treatment temperatures. Data were estimated from equation 2 and 3. Treatment conditions: Electric field strength 25 kV/cm; treatment media: apple juice (continuous lines) and apple juice supplemented with 50 ppm of LAE (dotted lines); initial temperatures 20°C (blue), 30°C (green) and 40°C (red).

Inactivation of Other PEF Resistant Strains of Different Microorganisms Suspended in Apple Juice by Continuous PEF Treatments in the Presence of LAE.

Inactivation of additional PEF resistant strains such as *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459, and *Salmonella* Typhimurium 878 was investigated to elucidate whether the application of PEF treatments combined with LAE provides the possibility of inactivating a wide spectrum of

Table 3: Significant variables and their interactions for polynomial equations describing inactivation of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice and apple juice supplemented with 50 ppm of LAE by PEF. E is electric field strength (kV/cm), T_{in} is the inlet temperature (°C), t is treatment time (μs).

	(Eq.2) Apple juice	(Eq.3) Apple Juice + LAE
	Coefficient	Coefficient
<i>Intercept</i>	-2.41	-7.19
E	0.09	-
T_{in}	0.08	0.58
t	0.19	0.25
E^2	-	0.0059
T_{in}^2	-	-0.067
t^2	-0.00027	-
$E \cdot T_{in}$	-0.0031	-0.010
$E \cdot t$	-0.0068	-0.0099
$T_{in} \cdot t$	-0.0023	-0.0043
<i>P-value</i>	<0.0001	<0.0001
<i>F-ratio</i>	227.15	100.78
R^2	0.981	0.946
<i>Adj-R²</i>	0.978	0.937
<i>RMSE</i>	0.20	0.55
B_f	0.97	1.00
A_f	1.25	1.18

R^2 : r-squared; *Adj-R²*: Adjusted r-squared; *RMSE*: Root Mean Squared Error; B_f : Bias factor; A_f : Accuracy factor.

pathogenic microorganisms in apple juice. Considering representations of Figure 4 and processing flexibility, the selected treatment conditions were electric field strength of 25 kV/cm and initial treatment temperature of 35 °C. As an inactivation higher of 5 Log₁₀ cycles was obtained in *E. coli* O157:H7 at the highest outlet temperature assayed (55 °C), in this study, selected outlet temperatures were 45 (21.5 μs and 41.6 kJ/kg), 50 (31.5 μs and 62.4 kJ/kg), and 55 °C (38.4 μs and 83.2 kJ/kg). This was done to verify the possibility of reducing outlet temperature and as a consequence, the specific energy input of the treatments. Figure 5 shows the Log₁₀ cycles of inactivation reached for each strain when treated in apple juice and apple juice supplemented with 50 ppm of LAE at different outlet temperatures. In apple juice, an inactivation of 5 Log₁₀ cycles or higher was only reached in the strain of *L. monocytogenes* 5672 when the outlet temperature was 55 °C. However, when LAE was added to the apple juice, this level of inactivation was obtained at an outlet

temperature of 45 °C in *Salmonella* Typhimurium 878, at an outlet temperature of 50 °C in *L. monocytogenes* 5672, *E. coli* O:157:H7, and *Salmonella* Typhimurium 878, and at 55 °C in the four strains investigated. In apple juice without LAE, it was necessary to increase the outlet temperature until 60 °C to obtain an inactivation higher than 5 Log₁₀ cycles reduction in *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459, and *Salmonella* Typhimurium 878 and until 65 °C to obtain this inactivation in *E. coli* O:157:H7 (data non shown).

DISCUSSION

Acid fruit juices have traditionally been considered safe because pathogens might not be able to grow in the juice. However, several outbreaks associated with the consumption of unpasteurized juices have demonstrated that these products can be a vehicle of foodborne illness caused by pathogens such as *Salmonella* spp or *E. coli* O157:H7 (Bull et al., 2005). The low infectious dose of these pathogens requires including control measures during juice processing. Although conventional thermal pasteurization of fruit juices requires temperatures lower than 100 °C, loss of nutritional and organoleptic quality is normally associated with mild heat treatments (Alwazeer, Cachon & Divies, 2002).

In this investigation, the potential of PEF as an alternative to thermal processing to achieve an appropriate level of inactivation for several strains of pathogenic microorganisms in apple juice has been investigated. This study has been conducted using treatment conditions commercially applicable in terms of electric field strength, number of pulses, and total specific energy input. A parallel electrode treatment chamber has been used because this design is the best configuration in terms of homogeneous distribution of the electric field strength (Jaeger, Meneses & Knorr, 2009). A uniform processing of food when passing through the treatment chamber is one of the most important criteria for a successful evaluation of safe and effective processes.

Results obtained in this paper showed that the inactivation of *E. coli* O157:H7 by PEF in continuous treatment increased by increasing the inlet temperature and electric field strength and a given Log₁₀ reduction can be achieved with less specific energy input by increasing these process parameters. Although other studies support these observations, it must be noted that differences exist in the microorganisms investigated, medium, and in the treatment conditions applied, making comparisons difficult. Generally, these studies have not been conducted with target microorganisms of public health concern and using electric field strengths in the range of 30 to 50 kV/cm (Walkling-Ribeiro, Nocci, Cronin, Lyng & Morgan, 2008; Mareselles-Fontanet, Puig, Olmos, Mínguez-Sanz & Martín-Belloso, 2009; McNamee et al., 2010; Guerrero-Beltrán, Sepúlveda, Góngora-Nieto, Swanson & Barbosa-Cánovas, 2010). Heinz et al. (2003) obtained similar conclusions on the inactivation of a strain of *E. coli* in apple juice, but exponential decay pulses 34 kV/cm and inlet temperatures until 70 °C were used. These higher inlet temperatures make discriminating thermal effects from PEF effects on microbial inactivation difficult.

Although the treatment time and specific energy required to the inactivation of *E. coli* O157:H7 decreased considerably by increasing the inlet temperature, the highest level of inactivation obtained considering commercial applicability of the treatments in terms of electric field strength, treatment time and specific energy and an outlet temperature of 55 °C was around 4 Log₁₀ cycles as maximum. According to the FDA regulations, this reduction is insufficient to reach an appropriate level

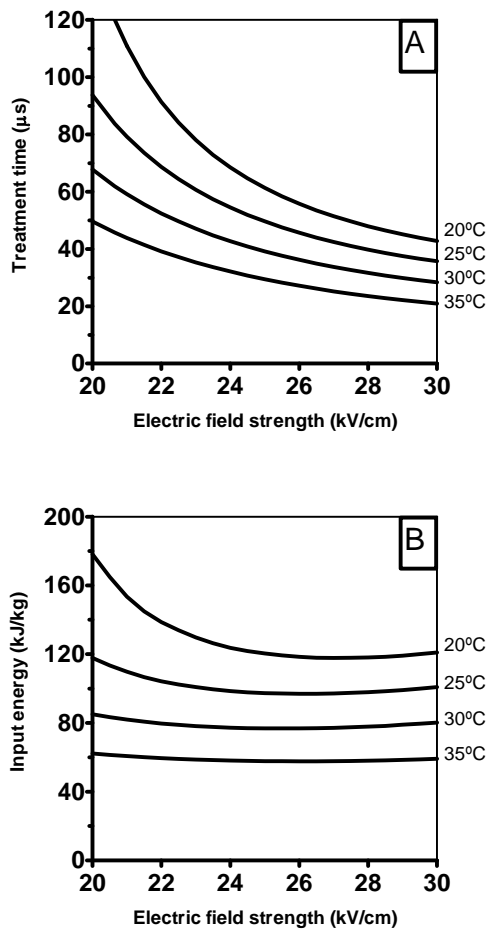


Figure 4: Estimated treatment time (A) and specific energy input (B) required to inactivate 5 Log_{10} cycles the population of *E. coli* O157:H7 suspended in apple juice supplemented with LAE (50 ppm) by PEF at different electric field strengths and initial treatment temperatures. Data were estimated from equation 3.

of public health protection in fruit juices. Combining PEF treatments at moderate temperatures with the presence of LAE (50 ppm) increased the lethality of the treatments on *E. coli* O157:H7 above 5 Log_{10} cycles reduction. It has been reported that LAE affects negatively charged compounds, such as microbial proteins present in cellular membranes, resulting in increased membrane permeability (Rodríguez et al., 2004). The effectiveness of PEF treatments in the presence of LAE could be explained because the site of action of both agents is the cytoplasmic membrane of microorganisms.

The models presented in this paper that estimate the treatment time and specific energy required to obtain 5 Log_{10} cycles of inactivation on the population of *E. coli* O157:H7 in apple juice added with LAE at different electric field strengths, and treatment temperatures are a useful guide for assisting equipment manufactures in apparatus design, and fruit juice processors in selecting treatment conditions to achieve an effective reduction in the population of this microorganism (Bull et al., 2005).

Addition of LAE to the apple juice has proven effective to obtain substantial inactivation of other pathogenic PEF resistant strains of both Gram-positive and Gram-negative microorganisms. Several authors have observed that PEF in combination with antimicrobials such as nisin, lysozyme, pediocin ACH, or organic acids is effective in order to enhance microbial inactivation (Kalchayanand, Sikes, Dunne & Ray, 1994; Liu, Yousef & Chism, 1996; Terebiznik et al., 2000; Pol, Mastwijk, Slump, Popa & Smid, 2001a; Pol et al., 2001b; Liang et al., 2002; Gallo et al., 2007; Arroyo, Somolinos, Cebrián, Condón & Pagán, 2010). However, in these studies, the efficacy of these antimicrobials in both Gram-positive and Gram-negative microorganisms has not been demonstrated.

Data obtained in this study have also demonstrated that combining PEF with moderate temperatures also permits a reduction of the population of the four pathogenic strains investigated of 5 Log_{10} cycles or higher. However, to obtain this level of inactivation, it is necessary to increase the treatment time, and as consequence, the outlet temperature and energy cost of the process. *E. coli* O157:H7, which was the most resistant PEF microorganisms in the absence of LAE, required that the

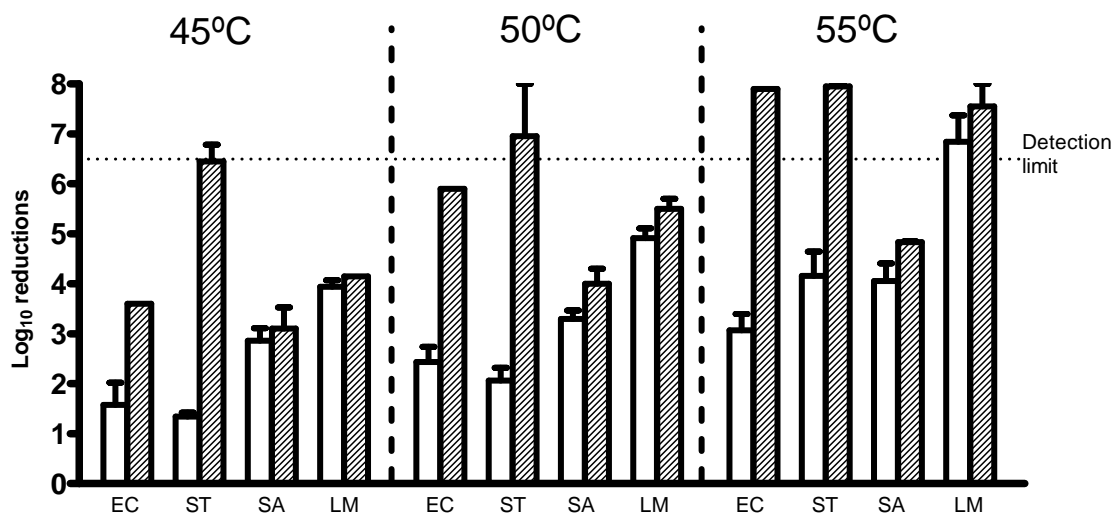


Figure 5: Inactivation of *E. coli* O157:H7 (EC), *Salmonella* Typhimurium 878 (ST), *S. aureus* 4459 (SA) and *L. monocytogenes* 5672 (LM) suspended in apple juice (white bars) and apple juice supplemented with 50 ppm of LAE (striped bars) by PEF (25 kV/cm) at an inlet temperature of 35°C and different outlet temperatures (45, 50 and 55°C).

outlet temperature was 65 °C to obtain an inactivation higher than 5 Log₁₀ cycles. This temperature is close to those used in thermal processing; however, the residence time to obtain this inactivation by PEF processing was much shorter (0.8 s).

Although the increment of the temperature of the untreated juice would increase the energetic cost of the PEF process, it has been proposed that the thermal energy dissipated in the product due to its resistance to the current flow during the PEF treatment could be recovered in a heat exchanger for preheating the untreated product (Heinz et al., 2003; Toepfl et al., 2006). An empirical model developed by these authors demonstrated that the operation of the process should be possible without requiring additional energy for heating or cooling.

In conclusion, this paper demonstrated that application of PEF at moderate temperatures or the application of PEF at moderate temperatures in the presence of LAE provides the possibility to develop pasteurization processes for apple juice at lower temperatures than those used in conventional thermal pasteurization with a residence time of one second. When the treatment was applied to the apple juice, a treatment of 25 kV/cm for 63 µs corresponding with an outlet temperature of 65 °C and input energy of 125 kJ/kg was required to achieve more than 5 Log₁₀ cycles in the four strains of pathogenic microorganism investigated. The addition of LAE permits a reduction in the treatment time required to obtain an equivalent inactivation in the four microorganisms to 38.4 µs, the outlet temperature to 55 °C, and the input energy to 83.2 kJ/kg. These treatment conditions should be considered in the future during studies on the impact of PEF on shelf-life and quality attributes of foods.

ACKNOWLEDGEMENTS

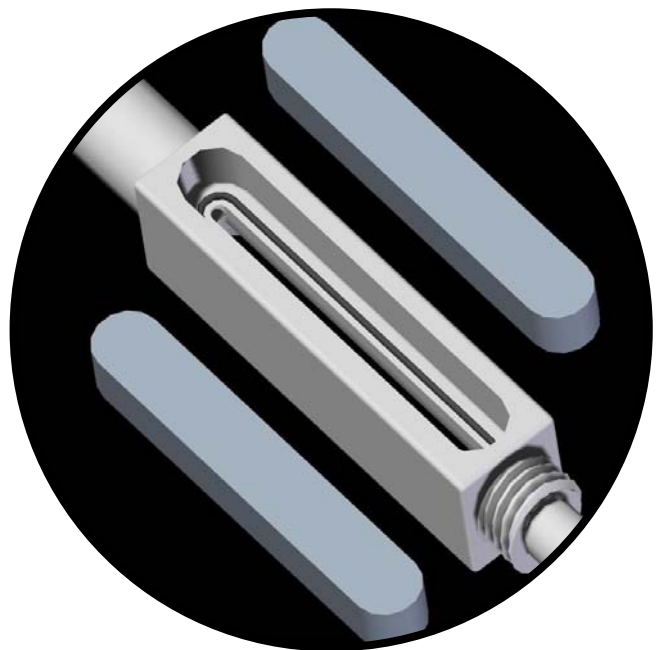
The authors thank the European Commission (FP6, 015710-2NOVELQ) and CICYT (project AGL 2007-62738) for the support. G.S. and S.M. gratefully acknowledge the financial support for their doctoral studies from the Spanish Ministry for Education and Science, and the Department of Science, Technology and University of the Aragon Government.

REFERENCES

- Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Comparative study on color, viscosity and related enzymes of tomato juice treated by high intensity pulsed electric fields or heat. *European Food Research and Technology*, 227 (2), 599-606.
- Alwazeer, D., Cachon, R., & Divies, C. (2002). Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice. *Journal of Food Protection* 65, 1586-1589.
- Arroyo, C., Somolinos, M., Cebrián, G., Condón, S., & Pagán, 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., & Altunakar, B. (2006). Pulsed Electric Fields Processing of Foods: An Overview. In J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 3-21). Springer: Nueva York.
- Bull, M.K., Szabo, E.A., Cole, M.B., & Stewart, C.M. (2005). Toward validation of process criteria for high-pressure processing of orange juice with predictive models. *Journal of Food Protection*, 68, 949-54.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., & Swanson, B.G. (1999). Inactivation of *Listeria innocua* in skimmed milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 51: 19-30.
- Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, J., & Crick, E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, 111, 439-447.
- Cortés, C., Esteve, M.J., & Frígola, A. (2008). Effect of refrigerated storage on ascorbic acid content of orange juice treated by pulsed electric fields and thermal pasteurization. *European Food Research and Technology*, 227 (2), 629-635.
- Gallo, L. I., Pilosof, Am. M. R., & Jagus, R. J. (2007). Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *Journal of Food Engineering*, 79, 188-193.
- Guerrero-Beltrán, J. A., Sepúlveda, D. R., Gongora-Nieto, M. M., Swanson, B., & Barbosa-Canovas, G. V. (2010). Milk thermization by pulsed electric fields (PEF) and electrically induced heat. *Journal of Food Engineering* 100 (1), 56-60.
- Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 165-175.
- HHS (Health and Human Services), FDA (Food and Drug Administration) (2001). Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and imprinting of juice; final rule. *Federal Register*, 66, FR 6137-6202.
- Jaeger, H., Meneses, N., & Knorr, D. (2009). Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 470-480.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P., & Ray, B. (1994). Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4174-4177.
- Liang, Z., Mittal, G.S., & Griffiths, M.W. (2002). Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 65, 1081-1087.
- Liu, X., Yousef, A.E., & Chism, G.W. (1996). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric fields. *Journal of Food Safety*, 16, 287-299.
- Marsellés-Fontanet, A.R., Puig, A., Olmos, P., Mínguez-Sanz, S., & Martín-Belloso, O. (2009). Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (3), 159-165.
- McNamee, C., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, D.A., Morgan, D.J., & 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 (1-2) 13-18.
- Min, S., Jin, Z.T., Min, S.K., Yeom, H., & Zhang, Q.H., (2003). Commercial-Scale Pulsed Electric

- Field Processing of Orange Juice. *Food Chemistry and Toxicology*, 64 (4), 1265-1271.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)** (2006). Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection*, 69, 1190-1216.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., & Martín-Belloso, O.** (2007). Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2) 192-200.
- Pol, I. E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E., & Smid, E. J.** (2001a). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 64, 1012-1018.
- Pol, I. E., van Arendonk, W. G. C., Mastwijk, H. C., Krommer, J., Smid, E. J., & Moezelaar, R.** (2001b). Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 1693-1699.
- Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F.** (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S29-S42.
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G.V.** (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews on Food Science* 43, 265-285.
- Rodriguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X., & Manresa, A.** (2004). Cellular effects of monohydrochloride of l-arginine, N⁶-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 903-912.
- Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, 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.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J.** (2010a). Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Food Microbiology*, 27, 550-558.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., & Raso, J.** (2010b). Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering*, 100, 349-356.
- 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.
- Sepúlveda, D.R., Góngora-Nieto, M.M., San-Martín, M.F., & Barbosa-Cánovas, G.V.** (2005). Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 38, 167-172.
- Terebiznik, M. R., Jagus, R. J., Cerrutti, P., de Huergo, M. S., & Pilosof, A. M. R.** (2000). Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 63, 741-746.
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D.** (2006). Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Reviews International*, 22, 405-423.
- Tonello C.** (2011). Case studies on High-Pressure Processing of Foods. In Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G.V., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D.F., & Yuan, J.T.C. (Eds.), *Nonthermal processing Technologies for Food* (pp. 36-50). Willey-Blackwell: Oxford.
- Walking-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J.** (2008). Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 73, 395-399.
- Walking-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.
- Wouters, P., Álvarez, I., & Raso, J.** (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 112-121.
- Zhao, W., Yang, R., Lu, R., Wang, M., Qian, P., & Yang, W.** (2008). Effect of PEF on microbial inactivation and physical-chemical properties of green tea extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 425-431.

5. DISCUSIÓN



Los objetivos tradicionales de la conservación de los alimentos han sido prolongar su vida útil, para que éstos puedan ser consumidos días, semanas o incluso meses después de su procesado, y garantizar que los productos que llegan al consumidor sean seguros, es decir, que no vehiculen agentes que puedan causar enfermedades. Sin embargo, en los últimos años, la industria alimentaria demanda sistemas de conservación que, además de cumplir con estos dos objetivos, afecten lo menos posible a las características sensoriales y nutritivas de los alimentos (da Cruz *et al.*, 2010). Con objeto de responder a esta demanda, se están investigando distintas alternativas a los tratamientos térmicos, que, al igual que el calor, sean capaces de inactivar microorganismos, aunque durante su aplicación no se alcanzan las temperaturas que se utilizan en el procesado térmico (Lado y Yousef, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004; Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005; Mañas y Pagán, 2005; Wan *et al.*, 2009). Con estas técnicas se pretende obtener alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, debido a su capacidad para inactivar a los microorganismos patógenos presentes en los alimentos, sin afectar a los compuestos termosensibles que definen la calidad de los alimentos (Arnoldi *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004; Rajkovic *et al.*, 2010).

Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) es una de las tecnologías que se están investigando para inactivar a los microorganismos presentes en los alimentos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesado térmico. La aplicación de campos eléctricos de alto voltaje durante periodos de tiempo de microsegundos provoca una modificación irreversible de la permeabilidad de las membranas celulares de los microorganismos, lo que puede causar la inactivación de las formas vegetativas de las bacterias, mohos y levaduras (Saulis, 2010). Sin embargo, las formas esporuladas de las bacterias y de los mohos son resistentes a estos tratamientos (Pagán *et al.*, 1998; Pol *et al.*, 2001), por lo que las aplicaciones de la tecnología de los PEAV deben centrarse en los procesos de pasteurización de los alimentos. Aunque tradicionalmente los tratamientos de pasteurización se han asociado exclusivamente con el calor, el desarrollo de otras tecnologías capaces de inactivar microorganismos en los alimentos ha provocado que se consideren otras técnicas para conseguir los objetivos que persigue la pasteurización. De este modo, la pasteurización ha sido recientemente redefinida por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América como “cualquier proceso, tratamiento o combinación que es aplicado a los alimentos para reducir la población del

microorganismo más resistente con relevancia en la salud pública, hasta un nivel que no suponga un riesgo para la salud pública en unas condiciones normales de distribución y almacenamiento” (NACMCF, 2006). El principal objetivo de la pasteurización es, por lo tanto, garantizar que los alimentos que llegan al consumidor estén libres de flora patógena. Este tratamiento, además de inactivar la flora patógena, reduce la flora alterante, lo que contribuye a prolongar el tiempo de vida útil de los alimentos (Min *et al.*, 2007; Altuntas *et al.*, 2010). Sin embargo, tras la pasteurización, en los alimentos pueden estar presentes esporos bacterianos y otros microorganismos sin relevancia en la salud pública, por lo que, tras el tratamiento es necesario refrigerar los alimentos con el fin de evitar o retrasar el crecimiento de los microorganismos que sobrevivan. En ocasiones, además de la refrigeración, se utilizan otras técnicas de conservación, como el envasado en atmósferas modificadas o la adición de antimicrobianos para mejorar la conservación de estos alimentos (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).

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

En los últimos 15 años se han realizado numerosos estudios sobre la inactivación microbiana por PEAV (Wouters *et al.*, 2001b; Álvarez *et al.*, 2006; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2008a). Los objetivos de estos estudios han sido fundamentalmente conocer los principales factores que influyen en la resistencia microbiana a los PEAV, describir la cinética de inactivación para desarrollar modelos matemáticos y comprender mejor los mecanismos implicados en la inactivación microbiana por estos tratamientos. A pesar de la gran cantidad de investigaciones realizadas, resulta difícil obtener de ellas los datos necesarios para el diseño de procesos de pasteurización por PEAV debido a las grandes diferencias en las condiciones experimentales y los equipos utilizados por los distintos autores, lo

que dificulta enormemente la comparación de los resultados obtenidos en distintos laboratorios.

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

Con objeto de que los resultados obtenidos fueran directamente comparables, en todos los estudios realizados se ha trabajado con las mismas cepas microbianas y, para la aplicación de los tratamientos, tanto en cámaras de tratamiento estáticas como en flujo continuo, se ha utilizado el mismo generador de PEAV, que se caracteriza por aplicar pulsos de onda cuadrada.

5.1. SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A LOS PEAV PARA ESTABLECER CRITERIOS DE PROCESADO PARA LA PASTEURIZACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos por PEAV deben definirse para aquellos microorganismos más resistentes a estos tratamientos (NACMCF, 2006). Estudios realizados por diferentes autores han demostrado que los microorganismos más resistentes a una determinada tecnología de inactivación no tienen por qué ser los más resistentes a otra tecnología. Por ejemplo *Salmonella* Senftenberg 775W es una de las serovariedades más resistentes a los tratamientos térmicos pero, sin embargo, es más sensible a las altas presiones hidrostáticas o a los PEAV que otras serovariedades de *Salmonella* más sensibles al calor (Metrick *et al.*, 1989; Álvarez *et al.*, 2000). Por lo tanto, los microorganismos de referencia para establecer los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos dependerán de la tecnología que se utilice.

La mayoría de las investigaciones publicadas sobre la resistencia microbiana a los PEAV están basadas en estudios realizados con una sola cepa, por lo que la información de la que se disponía antes de la realización de esta Tesis Doctoral sobre la variabilidad en la resistencia a los PEAV de cepas de distintos microorganismos era escasa. Los pocos estudios realizados indicaban que las diferencias en resistencia entre cepas podrían ser importantes (Lado y Yousef, 2003; Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006; Somolinos *et al.*, 2008a; Cebrián, 2009), por lo tanto, éste era un factor a considerar a la hora de definir los criterios de procesado. Por otro lado, es conocido que, además de la resistencia intrínseca del microorganismo a los PEAV, otros factores, como las características del medio de tratamiento o la fase de crecimiento, pueden tener una influencia importante en la sensibilidad de los microorganismos a esta tecnología (Aronsson y Rönner, 2001; Álvarez *et al.*, 2002; Cebrián *et al.*, 2007). De entre las características del medio de tratamiento, se ha demostrado que el pH juega un papel decisivo en la resistencia microbiana a los PEAV. Generalmente, los microorganismos Gram-positivos son más resistentes a los PEAV en medios de pH neutro que los microorganismos Gram-negativos, mientras que en medios de pH ácido estos últimos son más resistentes que los Gram-positivos (García *et al.*, 2005a).

A la vista de estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral, se comparó la resistencia a los PEAV de cinco cepas de cuatro microorganismos patógenos, dos Gram-positivos - *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*- y dos Gram-negativos - *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium- con objeto de identificar las cepas de referencia para la definición de los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos por PEAV. La resistencia a los PEAV se investigó en medios de pH 7,0 y 4,0, y debido a que estudios previos indicaban que los microorganismos en fase de crecimiento estacionario son más resistentes a los PEAV que los microorganismos en fase de crecimiento exponencial, en todos los casos, se estudió la resistencia con células en fase de crecimiento estacionario (Cebrián *et al.*, 2007).

En la Figura 5.1 se compara la resistencia de las cinco cepas de cada uno de los cuatro microorganismos patógenos a un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 200 μ s) en medios de pH 4,0 y 7,0 cuando se recuperaron en un medio no selectivo. Cada punto de la gráfica se corresponde con los ciclos logarítmicos de inactivación obtenidos para cada una de las cepas, mientras que la línea horizontal representa el valor medio de los ciclos de inactivación obtenidos en las cinco cepas de cada uno de los microorganismos.

Como se puede observar, la resistencia a los PEAV varió considerablemente entre las cinco cepas de *E. coli* investigadas en ambos medios de tratamiento. En todos los casos, la resistencia individual de cada cepa fue mayor en el medio de pH 4,0 que en el medio de pH 7,0. En el medio de pH 4,0 se alcanzó una máxima inactivación de alrededor de 3 ciclos logarítmicos en la cepa más sensible, mientras que el tratamiento aplicado no afectó a la viabilidad de la cepa más resistente. Por otra parte, en el medio de pH 7,0 la inactivación de la población de la cepa más resistente fue de 1,7 ciclos logarítmicos y la de la más sensible de 4,7 ciclos logarítmicos. Independientemente del pH del medio de tratamiento, las cepas de *E. coli* W3110 y O157:H7 fueron las más resistentes al tratamiento, mientras que la más sensible fue la cepa de *E. coli* BJ4L1. Esta última cepa es una cepa mutada que carece del factor sigma (*rpoS*) de fase estacionaria, al que se le atribuye la responsabilidad de que las células aumenten su resistencia cuando se encuentran en fase estacionaria de crecimiento (Huissman *et al.*, 1996; Kroghfelt *et al.*, 2000). La mayor sensibilidad a las altas presiones hidrostáticas o los PEAV de las células de *E.*

coli que carecen de este factor ya había sido observado por otros autores (Robey *et al.*, 2001).

En el caso de las cepas de *Salmonella* Typhimurium, éstas fueron en su conjunto más sensibles al tratamiento que las del otro microorganismo Gram-negativo investigado -*E. coli*- en ambos medios de tratamiento. Además, la variabilidad en la resistencia entre las cinco cepas fue menor que entre las cepas de *E. coli*. El pH del medio de tratamiento apenas afectó a la resistencia de las cepas de este microorganismo. En ambos medios, el tratamiento inactivó entre 3 y 4 ciclos logarítmicos la población de las cinco cepas investigadas. Por otro lado, las cepas más resistentes al tratamiento en medio de pH ácido no son necesariamente también las más resistentes en pH neutro. Las cepas de *Salmonella* Typhimurium más resistentes al tratamiento de PEAV aplicado en tampón de pH 4,0 fueron la 443 y la 722, las cuales fueron las más sensibles a pH 7,0. Hay que destacar que en medio de pH 4,0 las cepas de *Salmonella* Typhimurium fueron más sensibles al tratamiento que las cepas de *E. coli*. En este medio, la reducción de la cepa de *Salmonella* Typhimurium más resistente fue de alrededor de 3 ciclos logarítmicos, lo que se correspondía con la inactivación obtenida en la cepa más sensible de *E. coli*.

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

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

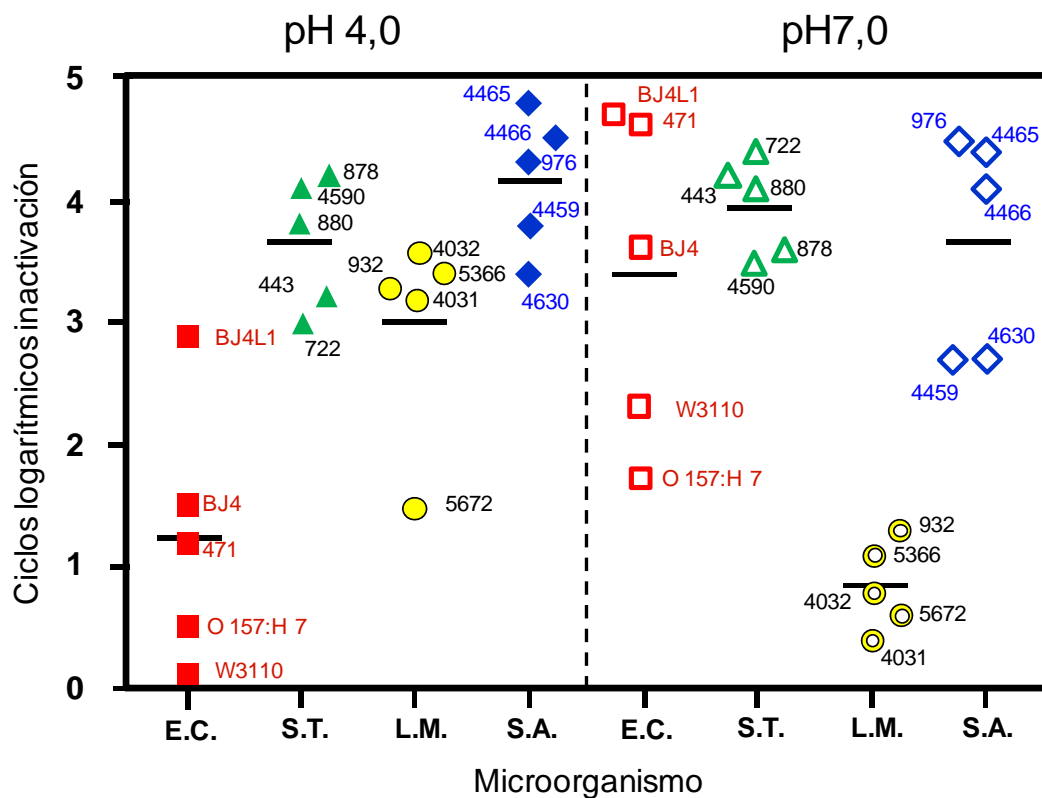


Figura 5.1. Comparación de la resistencia a los PEAV de las cepas investigadas en medios de pH 4,0 y pH 7,0 . E.C.: *Escherichia coli* (■;□), S.T.: *Salmonella Typhimurium* (▲;△), L.M.: *Listeria monocytogenes* (●;○), S.A.: *Staphylococcus aureus* (◆;◇). Las líneas horizontales representan la inactivación media entre las cinco cepas de cada microorganismo. Condiciones de tratamiento: 30 kV/cm, 200 μs.

En conclusión, las cepas más resistentes en el medio de pH 4,0 fueron las cepas de *E. coli* W3110 y O157:H7 y en el medio de pH 7,0 las cepas de *L. monocytogenes* 4031 y 5672. Por lo tanto, este estudio confirma resultados obtenidos por otros autores sobre la influencia del pH en la resistencia microbiana a los PEAV según los cuales la flora Gram-positiva es más resistente en los medios de pH neutro, y la flora Gram-negativa lo es en los medios de pH ácido (García *et al.*, 2005a). Desde un punto de vista práctico, estos resultados indican que, en función del pH del alimento, el microorganismo más resistente que ha de utilizarse como referencia para establecer los criterios de procesamiento puede ser diferente y probablemente se corresponderá con un microorganismo Gram-positivo en los medios de pH neutro y con un microorganismo Gram-negativo en los medios de pH ácido.

Con objeto de obtener datos cinéticos sobre la inactivación microbiana por PEAV de las cepas resistentes a los tratamientos, para poder desarrollar modelos

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

5.2. MODELIZACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE LAS CEPAS RESISTENTES A LOS PEAV PARA ESTABLECER LOS CRITERIOS DE PROCESADO NECESARIOS PARA LA PASTEURIZACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Como se ha indicado anteriormente, el objetivo de la pasteurización es reducir la población de los microorganismos patógenos que puede vehicular el alimento a un nivel que no supongan un riesgo para la salud del consumidor. El número de ciclos logarítmicos que es necesario reducir la población microbiana, dependerá de la concentración a la que habitualmente se encuentre este microorganismo en la materia prima, considerando las posibles variaciones que pueda haber en la concentración del microorganismo y del denominado *Objetivo de Seguridad Alimentaria* (del inglés, *Food Safety Objective*, FSO) (ICMSF, 2002). Este objetivo de seguridad alimentaria lo deberían establecer las agencias regulatorias, basándose en la dosis infectiva del microorganismo de referencia. También es necesario considerar si el microorganismo al cual se refiera el FSO es capaz de multiplicarse en el alimento en las condiciones normales de distribución y almacenamiento. Con la finalidad de posibilitar que los responsables de la gestión de riesgos puedan transmitir eficazmente objetivos precisos de seguridad alimentaria a la industria y a las empresas relacionadas con el sector, se definen éste y otros nuevos conceptos como los Criterios del Resultado, del Proceso y del Producto, que son necesarios considerar en el desarrollo de procesos de pasteurización por nuevas tecnologías de procesado y que fueron descritos en el apartado de Nuevos conceptos de seguridad alimentaria: aplicación para la pasteurización de los alimentos (1.2.1) de la sección *Introducción* de esta Tesis Doctoral. A modo de recordatorio, la definición de cada uno de estos conceptos se resume en la Tabla 5.1.

Se denomina *Criterios del Resultado* (del inglés, *Performance Criterion*) a los ciclos logarítmicos que es necesario reducir la población del microorganismo de referencia (ICMSF, 2002). Un ejemplo de criterios del resultado es el requerimiento establecido por la FDA para la pasteurización de zumos de frutas, consistente en reducir cinco ciclos logarítmicos la población de los microorganismos patógenos más resistentes que puedan vehicular estos alimentos (FDA, 2001). Esta reducción del microorganismo de referencia se puede conseguir aplicando un solo tratamiento o la combinación de varios.

Tabla 5.1. Definición de algunos conceptos de seguridad alimentaria (adaptado de Stewart *et al.*, 2002).

Concepto	Definición
Objetivo de Seguridad Alimentaria	La máxima concentración o frecuencia de un peligro –microbiológico, en el contexto de esta Tesis Doctoral- en un alimento, que se considera tolerable para la protección del consumidor.
Criterios del Resultado	El resultado de las medidas de control aplicadas a un paso o combinación de pasos para lograr el Objetivo de Seguridad Alimentaria
Paso	Cualquier punto, procedimiento, operación o etapa de la cadena alimentaria completa.
Criterios del Proceso	Los parámetros de control que se establecen en un paso o combinación de pasos del proceso.
Criterios del Producto	Los parámetros de control que se establecen de acuerdo con las características fisicoquímicas del producto.

En la legislación de EE.UU., se han definido distintos criterios del resultado para la pasteurización por calor de diferentes alimentos, como la leche o el huevo líquido, que podrían ser utilizados como referencia para la pasteurización por otras tecnologías alternativas, como los PEAV. Sin embargo, la legislación europea no indica las reducciones decimales que se deben conseguir en los microorganismos de

referencia, sino que lo que generalmente indica es que el producto tiene que estar libre de microorganismos patógenos o la máxima concentración permitida de estos microorganismos al final del período de su vida útil. En cualquier caso, es necesario aplicar unas condiciones de tratamiento que permitan conseguir los criterios establecidos por las agencias regulatorias. A estas condiciones de tratamiento se les denomina *Criterios del Proceso* (del inglés, *Process Criterion*) (ICMSF, 2002). Estos criterios del proceso dependerán de la tecnología que se utilice para la pasteurización del producto. Mientras que en el caso del calor son la temperatura y el tiempo de tratamiento, en el caso de los PEAV, los parámetros que definen los criterios del proceso son la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento o la energía específica (Aronsson y Rönnner, 2001; Álvarez *et al.*, 2006). El tiempo de tratamiento y la energía específica pueden considerarse como parámetros equivalentes para definir la intensidad de un tratamiento de PEAV cuando se aplican tratamientos utilizando pulsos de onda cuadrada. En el caso de que se utilicen pulsos de caída exponencial, la energía específica calculada a partir de la integración del voltaje y la intensidad de corriente aplicado podría ser un parámetro más preciso que el tiempo de tratamiento para definir los tratamientos de PEAV (Heinz *et al.*, 2001).

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

Para el desarrollo de modelos matemáticos predictivos útiles, en primer lugar es necesario definir cuáles son los principales factores que influyen en la eficacia del método de inactivación que se va a utilizar (Álvarez *et al.*, 2006). Estos factores deberán considerarse a la hora de obtener los datos experimentales que se utilizarán para el desarrollo de los modelos. En función de los estudios previos realizados por distintos autores y de nuestra propia experiencia, los factores que se consideraron para generar los modelos matemáticos de inactivación por PEAV obtenidos en esta Tesis Doctoral fueron la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, ya que se utilizaron pulsos de onda cuadrada, como parámetros de procesado, y el

pH, como principal propiedad de medio de tratamiento, que define la resistencia microbiana a los PEAV.

El desarrollo de modelos matemáticos predictivos para estimar la inactivación microbiana requiere, en primer lugar, la obtención de las denominadas gráficas de supervivencia, a partir de la representación del número de microorganismos supervivientes a lo largo del tiempo para distintos parámetros de procesado y condiciones del medio de tratamiento. Estas gráficas de supervivencia se describen mediante los denominados modelos primarios. A continuación se obtienen las expresiones matemáticas que describan la relación entre los parámetros de los modelos primarios y los parámetros de procesado y las condiciones medioambientales, denominadas modelos secundarios. Finalmente, la combinación de los modelos primarios y secundarios permite obtener los modelos finales o terciarios, capaces de estimar la inactivación microbiana en todo el rango de condiciones experimentales utilizadas para la obtención de los modelos (McMeekin y Ross, 2002).

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado modelos predictivos para estimar la inactivación por PEAV de las cuatro cepas más resistentes de los microorganismos patógenos investigados en el rango de pH en el que se encuentran la mayoría de los alimentos (3,5-7,0) y en un amplio rango de intensidades de campo eléctrico (15-35 kV/cm) y tiempos de tratamiento (hasta 500 μ s).

En la Figura 5.2 se muestra, a modo de ejemplo, algunas de las gráficas de supervivencia obtenidas para los cuatro microorganismos investigados. Como se puede observar, la cinética de inactivación microbiana por PEAV en los 4 microorganismos investigados no seguía la tradicional cinética de primer orden. Es decir, no había una relación lineal entre el logaritmo de la fracción de supervivientes y el tiempo de tratamiento. Al igual que han observado otros autores, las gráficas de supervivencia obtenidas eran cóncavas (Jayaram *et al.*, 1992, 1993; Álvarez *et al.*, 2000, 2002, 2003b, 2003d; Ohshima *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2005a,b; Cebrián *et al.*, 2007; Puértolas *et al.*, 2009). Este tipo de gráficas de supervivencia podrían ser debidas a la existencia de una distribución de resistencias en la población microbiana de modo que la primera parte de la curva, donde la velocidad de inactivación es más rápida, refleja la muerte de los microorganismos

más sensibles al tratamiento y, la segunda parte, donde la inactivación es más lenta, la muerte de los más resistentes. Una distribución heterogénea del campo eléctrico en la cámara de tratamiento o fenómenos de adaptación de los microorganismos al tratamiento también podrían explicar esta forma de las gráficas de supervivencia.

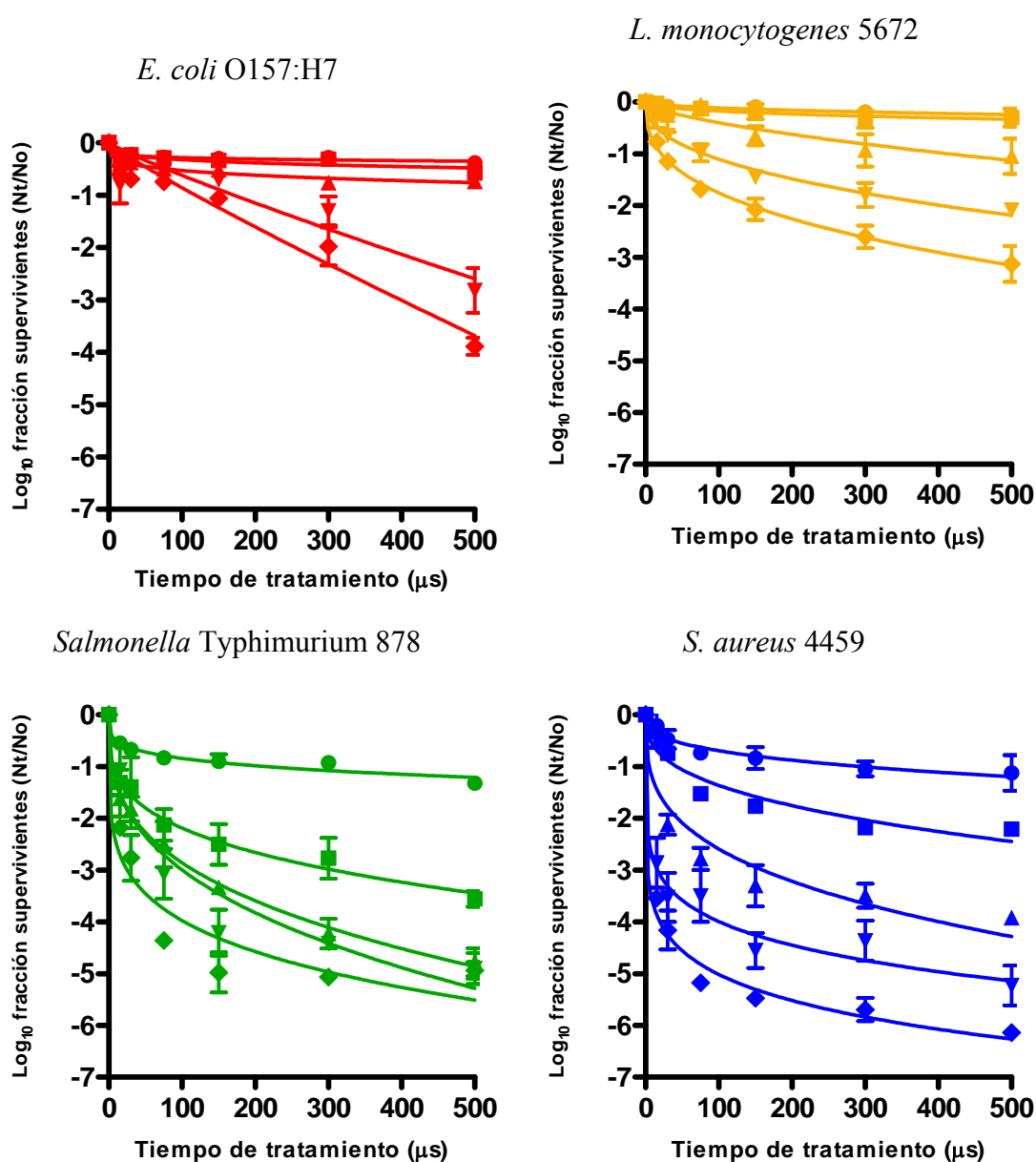


Figura 5.2. Influencia de la intensidad de campo eléctrico y del tiempo de tratamiento en la inactivación de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 5672, *Salmonella* Typhimurium 878 y *S. aureus* 4459 tratados por PEAV en medio de pH 3.5. Las líneas se corresponden con el ajuste del modelo estimado para cada uno de los microorganismos. Intensidades de campo eléctrico: 15 kV/cm (●), 20 kV/cm (■), 25 kV/cm (▲), 30 kV/cm (▼) y 35 kV/cm (◆); tampón McIlvaine pH 3,5 y conductividad 1 mS/cm; frecuencia: 1 Hz.

Aunque se han propuesto distintos modelos matemáticos para describir este tipo de gráficas de supervivencia, en el caso de la inactivación microbiana por PEAV, el modelo basado en la distribución de Weibull es el más utilizado:

$$(Ec. 5.1) \quad \text{Log}_{10} \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^\rho$$

donde N_t/N_0 es la fracción de supervivientes; t es el tiempo de tratamiento (μs); δ es el parámetro de escala y ρ es el parámetro de forma. Éste modelo es el más utilizado, por su sencillez y flexibilidad, y permite describir tanto gráficas de supervivencia lineales como cóncavas y convexas utilizando dos parámetros; el parámetro de forma (ρ), cuyo valor depende de la forma de la gráfica de supervivencia; y el parámetro de escala (δ), cuyo valor depende de la intensidad del tratamiento aplicado (Tabla 5.2). En la Figura 5.2, donde los puntos se corresponden con los valores experimentales y las líneas con el ajuste del modelo a estos valores, se muestra como este modelo describe adecuadamente las gráficas de supervivencia de los 4 microorganismos investigados.

Tabla 5.2. Expresiones matemáticas para los parámetros de forma (ρ) y escala (δ) de los modelos matemáticos basados en la distribución de Weibull, correspondientes a cada microorganismo estudiado.

Microorganismo	Modelos secundarios
<i>E. coli</i> O157:H7 (Ec. 5.2)	$\rho = 1,3084 - 0,0419 \cdot \text{pH}^2 + 0,0013 \cdot e^{\text{pH}}$ $\text{Log}_{10} \delta = -42,0281 + 0,4589 \cdot E + 31,7855 \cdot \text{pH} - 6,0850 \cdot \text{pH}^2 - 0,000253 \cdot E^3 + 0,3657 \cdot \text{pH}^3 - 0,5131 \cdot E \cdot \text{pH} + 0,00966 \cdot E^2 \cdot \text{pH} + 0,0519 \cdot E \cdot \text{pH}^2 - 0,00096 \cdot E^2 \cdot \text{pH}^2$
<i>Salmonella</i> Typhimurium 878 (Ec. 5.3)	$\rho = 0,2422$ $\text{Log}_{10} \delta = 8,08 - 0,407 \cdot E - 0,517 \cdot \text{pH} + 0,00535 \cdot E^2 + 0,038 \cdot \text{pH}^2 + 0,00421 \cdot E \cdot \text{pH}$
<i>L. monocytogenes</i> 5672 (Ec. 5.4)	$\rho = 0,408 + 0,302 \cdot e^{-e^{(-4,573 \cdot \text{pH} + 23,153)}}$ $\text{Log}_{10} \delta = 6,94 - 0,25 \cdot E - 0,07 \cdot \text{pH}^2 + 0,03 \cdot E \cdot \text{pH}$
<i>S. aureus</i> 4459 (Ec. 5.5)	$\rho = 0,959 + 1,267 \cdot e^{-e^{(-1,183 \cdot \text{pH} + 1,389)}}$ $\text{Log}_{10} \delta = -4,33 + 4,86 \cdot \text{pH} - 0,48 \cdot \text{pH}^2 - 0,15 \cdot E \cdot \text{pH} + 0,0014 \cdot E^2 \cdot \text{pH} + 0,0092 \cdot E \cdot \text{pH}^2$

E: intensidad de campo eléctrico (kV/cm)
pH: pH del medio de tratamiento
t: tiempo de tratamiento (μs)

En la Tabla 5.2 se muestran los modelos secundarios desarrollados para cada uno de los microorganismos que relacionan los parámetros del modelo de Weibull (ρ y δ) con las condiciones de tratamiento investigadas (intensidad de campo eléctrico – E – y pH del medio de tratamiento – pH). Estos modelos secundarios se obtuvieron utilizando técnicas de regresión múltiple. En el caso de *Salmonella* Typhimurium 878, el parámetro de forma (ρ) del modelo de Weibull era independiente de la intensidad del campo eléctrico y del pH del medio de tratamiento, por lo que se consideró un valor constante para este parámetro ($\rho=0.2422$), lo que simplificaba el modelo. Por otro lado, la ecuación que relaciona el valor δ con los otros dos parámetros de procesado es una ecuación de segundo orden que incluye el término campo eléctrico (E) y el pH del medio de tratamiento (pH). Como se muestra en la Tabla 5.2, los modelos secundarios desarrollados para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 5672 y *S. aureus* 4459 fueron más complejos que el modelo para *Salmonella* Typhimurium 878. Para estos tres microorganismos, el factor de forma (ρ) dependió del pH del medio de tratamiento, pero no del campo eléctrico aplicado. Además, para los cuatro microorganismos, el factor de escala (δ) dependió tanto del campo eléctrico como del pH del medio de tratamiento. Aunque es deseable que los modelos matemáticos que describen el comportamiento de los microorganismos sean lo más sencillos posibles (Wouters *et al.*, 2001a), su complejidad suele ser mayor cuanto mayor es el número de factores cuya influencia se quiere describir con la expresión matemática desarrollada, y cuanto mayor es el rango de condiciones experimentales consideradas para el desarrollo del modelo. Con objeto de poder estimar la inactivación de los cuatro microorganismos investigados en función del campo eléctrico, del tiempo de tratamiento y del pH del medio de tratamiento, fue necesario obtener los correspondientes modelos terciarios, sustituyendo en la ecuación del modelo de Weibull, los parámetros ρ y δ por las correspondientes expresiones de los modelos secundarios mostrados en la Tabla 5.2. La complejidad de las expresiones matemáticas obtenidas en estos modelos terciarios requiere el desarrollo de sencillas aplicaciones informáticas, que se pueden realizar mediante programas informáticos bien conocidos como Excel, para facilitar el uso de estos modelos a los potenciales usuarios de los mismos, como podrían ser los técnicos de las empresas alimentarias.

Los modelos matemáticos permiten comparar la resistencia microbiana en un amplio rango de condiciones experimentales, o establecer las condiciones de tratamiento para conseguir un determinado nivel de inactivación en función de las características del medio de tratamiento (McDonal y Sun, 1999; McMeekin y Ross, 2002). Por ejemplo, en la Figura 5.3, se compara la resistencia de las cuatro cepas resistentes de los cuatro microorganismos investigados en medios de distinto pH en un rango de intensidades del campo eléctrico comprendido entre 15 y 35 kV/cm. Aunque las gráficas de supervivencia a partir de las que se desarrollaron los modelos se obtuvieron aplicando tiempos de tratamiento de hasta 500 μ s y, por lo tanto, los modelos desarrollados permiten comparar la resistencia hasta este tiempo de tratamiento, en la Figura 5.3, la resistencia se comparó a un tiempo de tratamiento de 100 μ s. El criterio utilizado para elegir este tiempo de tratamiento fue comparar la resistencia a unas condiciones aplicables en la práctica industrial en un proceso en flujo continuo. Muchos estudios sobre la resistencia de los microorganismos a los PEAV en cámaras de tratamiento estáticas se han realizado aplicando tiempos de tratamiento mucho más largos que los que se podrían aplicar en la práctica a escala industrial en un proceso en flujo continuo. Las cámaras de tratamiento en flujo continuo para la aplicación de los tratamientos de PEAV no pueden tener unas dimensiones muy grandes porque requerirían equipos mucho más potentes de los que se dispone en la actualidad (Barbosa-Cánovas y Altunakar, 2006). Por ello, se estima que el tiempo de residencia del producto en estas cámaras deberá de ser como máximo de 1 segundo. Este tiempo de residencia tan corto no permite la aplicación de tiempos de tratamiento muy prolongados, es decir, de un elevado número de pulsos, ya que, aunque se pudieran aplicar estos tiempos de tratamiento, la energía que se liberaría en la cámara de tratamiento durante el corto periodo de tiempo correspondiente al tiempo de residencia, provocaría que se alcanzaran en el producto temperaturas similares a las que se utilizan en el procesado térmico, lo que limitaría las ventajas del tratamiento por PEAV.

Según se muestra en la Figura 5.3 las cepas de *S. aureus* 4459 y *Salmonella* Typhimurim 878, fueron las más sensibles a los PEAV independientemente de la intensidad del campo eléctrico y del pH del medio de tratamiento. La mayor inactivación obtenida en las cepas más sensibles fue entre 3 y 4 ciclos logarítmicos al campo eléctrico más elevado en medios de pH 3,5 y 4,5. A pH más altos (5,5 y 7,0)

la inactivación obtenida por este tratamiento fue de alrededor de 3 ciclos logarítmicos en los dos microorganismos. Por otro lado, las cepas de *L. monocytogenes* 5672 y de *E. coli* O157:H7 fueron las más resistentes. La cepa de *L. monocytogenes* 5672 mostró una gran resistencia a todos los pH del medio investigados. Hay que destacar que la cepa de *E. coli* O157:H7 mostró una elevada resistencia, similar a la de *L. monocytogenes* 5672, en los medios de pH 3,5, 4,5 y 7,0; sin embargo, en el medio de pH 5,5, su resistencia fue similar a la de *S. aureus* 4459 y *Salmonella* Typhimurim 878. Esta especial sensibilidad de un microorganismo a los PEAV a un pH intermedio, para un amplio rango de campos eléctricos, se trata de un comportamiento que no había sido descrito previamente.

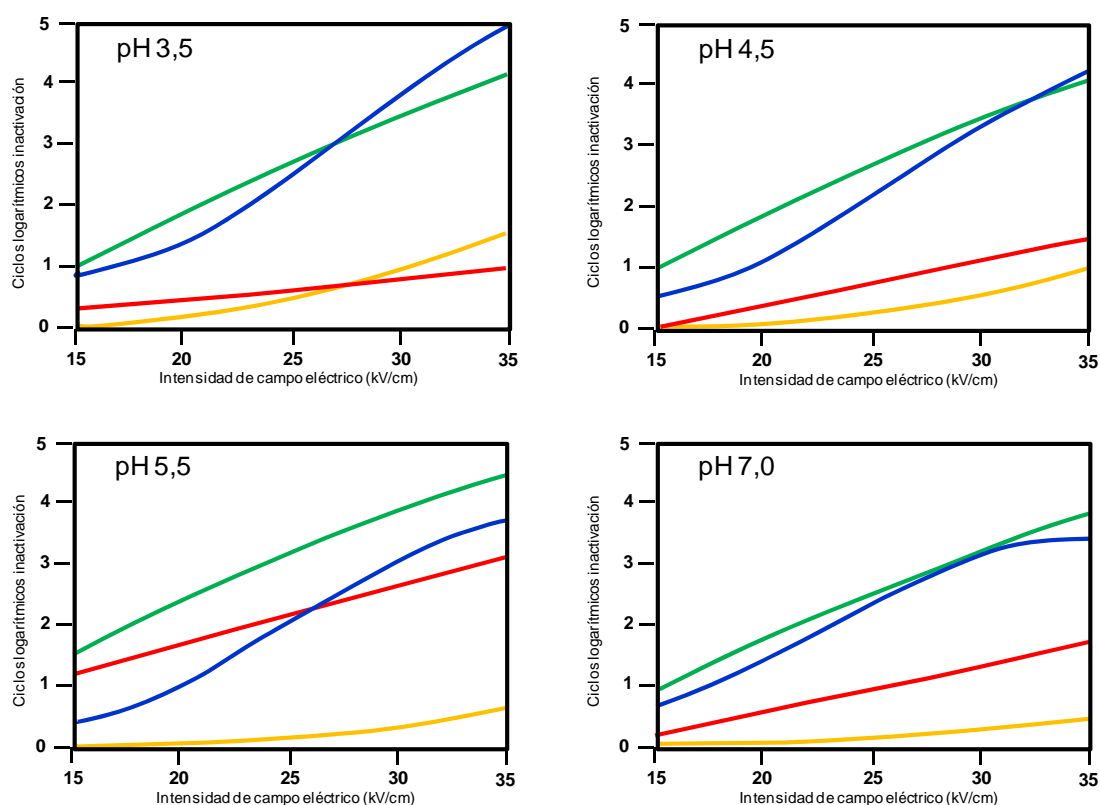


Figura 5.3. Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la inactivación estimada para *E. coli* O157:H7 (líneas rojas), *Salmonella* Typhimurium 878 (líneas verdes), *L. monocytogenes* 5672 (líneas naranjas) y *S. aureus* 4459 (líneas azules) tras tratamientos de PEAV de 100 μ s, en medios de pH de 3,5, 4,5, 5,5 y 7,0, a partir de las ecuaciones 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 respectivamente.

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

5.3. DESARROLLO DE PROCESOS COMBINADOS CON LOS PEAV PARA ESTABLECER PARÁMETROS DE PROCESADO EFICACES PARA LA PASTEURIZACIÓN DE LOS ALIMENTOS

La conservación de los alimentos por procesos combinados tiene como objetivo general combinar varios factores que afecten a la viabilidad y/o supervivencia microbiana con el fin de conseguir prolongar la vida útil y garantizar la seguridad de los alimentos, afectando lo menos posible a sus propiedades sensoriales y nutritivas (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Noci *et al.*, 2008; Walkling-Ribeiro *et al.*, 2008a; Pina-Perez *et al.*, 2009). Generalmente, la combinación de factores persigue reducir la intensidad con las que éstos se aplican para conseguir el efecto deseado sin que se vean alteradas las características del alimento. Sin embargo, en el caso de nuevas tecnologías de inactivación microbiana, como las altas presiones hidrostáticas o los PEAV, también se ha considerado combinar distintos factores con el objetivo de conseguir un nivel de inactivación suficiente para garantizar la seguridad de los alimentos a intensidades de tratamiento aplicables a escala industrial (Álvarez y Heinz, 2007). Las combinaciones más investigadas para

conseguir este segundo objetivo han consistido en la aplicación de estas nuevas tecnologías a temperaturas moderadas y/o en presencia de agentes antimicrobianos.

5.3.1. Influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV

Los resultados obtenidos por diferentes autores indican que la inactivación microbiana por PEAV aumenta al incrementar la temperatura de tratamiento, aunque las temperaturas a las que se apliquen los PEAV no sean letales para los microorganismos (Heinz *et al.*, 2003; Sepúlveda *et al.*, 2005; Craven *et al.*, 2008; Walkling-Ribeiro *et al.*, 2009a). Este efecto se ha atribuido a que el incremento de la temperatura aumenta la fluidez de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares (Stanley, 1991; Jayaram *et al.*, 1993). Al aumentar la fluidez de la membrana, disminuye su estabilidad y ésta se muestra más sensible a los fenómenos de electroporación provocados por los tratamientos de PEAV.

La mayoría de los estudios publicados sobre la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV han sido realizados en cámaras de tratamiento en flujo continuo (Heinz *et al.*, 2003; Sepúlveda *et al.*, 2005; Amilai *et al.*, 2007). En este tipo de estudios, generalmente se modifica la temperatura de entrada del medio de tratamiento a la cámara de procesado, mientras que la temperatura de salida varía en función de la energía eléctrica disipada durante el tratamiento de PEAV. Por lo tanto, en este tipo de tratamientos, la temperatura no es constante, ya que se va modificando durante el propio tratamiento. Además de no ser constante, también se ha demostrado, utilizando técnicas de simulación numérica, que la temperatura no se distribuye uniformemente en la cámara de tratamiento durante la aplicación del tratamiento de PEAV (Jaeger *et al.*, 2009^a; Buckow *et al.*, 2010). Esta falta de uniformidad en la distribución de la temperatura en la zona de tratamiento es especialmente importante cuando se utilizan cámaras de tratamiento colineales (Fiala *et al.*, 2001).

En esta Tesis Doctoral, con objeto de comprender mejor la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV, se diseñó, construyó y evaluó una cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos termostatados, que permitieron obtener por primera vez datos cinéticos de inactivación microbiana por

PEAV en un amplio rango de temperaturas (4-50°C) en condiciones prácticamente isotérmicas. En la Figura 5.4 se muestra un esquema de la cámara diseñada para este propósito. Como se observa, la cámara de tratamiento consta de dos electrodos de acero inoxidable, a través de los cuales se hace circular un líquido no conductor de la electricidad, que se puede atemperar a diferentes temperaturas. La temperatura a la que se hace circular este fluido depende de la temperatura a la que se quiera investigar la inactivación microbiana. El calor generado por la aplicación del tratamiento es retirado por el fluido refrigerante, que continuamente está circulando a través de los electrodos.

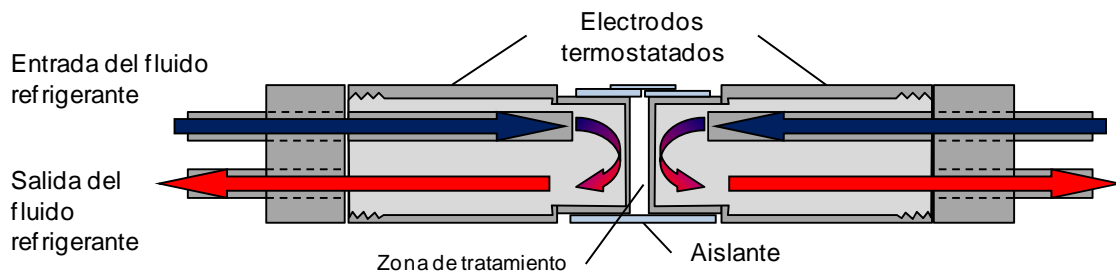


Figura 5.4. Esquema de la cámara de tratamiento estática con electrodos paralelos termostatados. Las flechas indican la dirección y el sentido del flujo del aceite dieléctrico por el interior de los electrodos. Separación entre electrodos: 2,5 mm; longitud del electrodo: 40,0 mm; diámetro del electrodo: 16,0 mm.

En la Figura 5.5 se muestra la evolución de la temperatura en el interior de la cámara de tratamiento durante la aplicación de un tratamiento de PEAV a distintas temperaturas iniciales. Como se observa, tras la aplicación de un tratamiento tan intenso como 50 pulsos de onda cuadrada de 3 μ s de duración a una intensidad de campo eléctrico de 30 kV/cm, la temperatura final nunca se incrementó en más de 4°C. La Figura 5.6 muestra la distribución de la temperatura estimada por técnicas de simulación numérica, en la cámara de tratamiento tras aplicar el tratamiento de PEAV anterior, a un medio en el que la temperatura inicial era 28,0°C. La temperatura osciló desde 29,7°C en el punto más frío a 32,1°C en el punto más caliente.

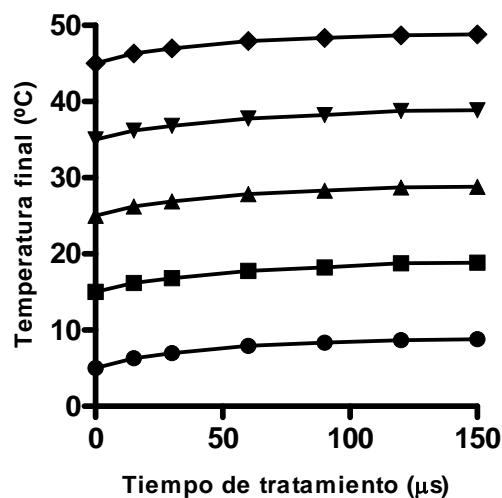


Figura 5.5. Incremento de la temperatura del medio de tratamiento tras la aplicación de PEAV a temperaturas iniciales de 5°C (●), 15°C (■), 25°C (▲), 35°C (▼) y 45°C (◆) utilizando la cámara de electrodos termostatados. Condiciones de tratamiento: 30kV/cm; 0,5 Hz, anchura de pulso de 3 μs.

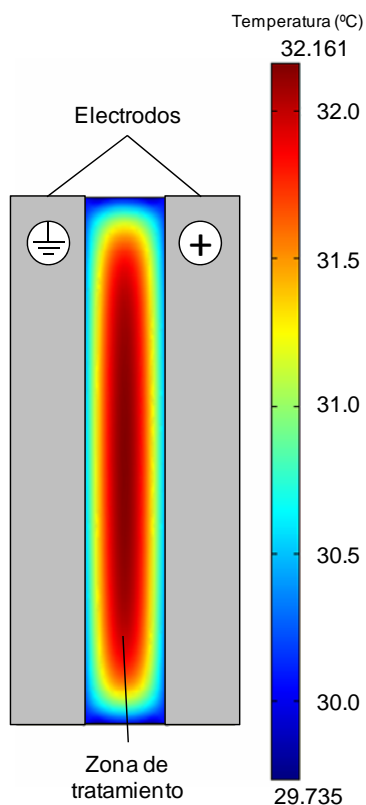


Figura 5.6. Representación de la temperatura estimada mediante simulación numérica dentro de la cámara de tratamiento con electrodos termostatados, tras aplicar un tratamiento de PEAV de 50 pulsos de onda cuadrada de 3 μs a 30 kV/cm. Temperatura inicial: 28°C.

Los datos obtenidos utilizando esta cámara de tratamiento demostraron que la temperatura de tratamiento tiene un efecto muy importante en la resistencia microbiana a los PEAV. La Figura 5.7 muestra la influencia de la temperatura de tratamiento en la resistencia de *Salmonella* Typhimurium 878 a los PEAV. Se observa que el incremento de la temperatura de tratamiento de 4 a 50°C aumentó la letalidad de un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 60 μ s) desde menos de 0,5 a 5 ciclos logarítmicos en un medio de pH 3,5. Por lo tanto, si el tratamiento se aplica a temperaturas superiores a la temperatura ambiente (50°C) se podría conseguir un nivel de inactivación en la cepa de *Salmonella* Typhimurium 878 resistente a los PEAV suficiente para garantizar la seguridad microbiológica del producto con un tiempo de tratamiento (60 μ s) inferior a los que se utilizaron para comparar la resistencia de las cuatro cepas en la Figura 5.3.

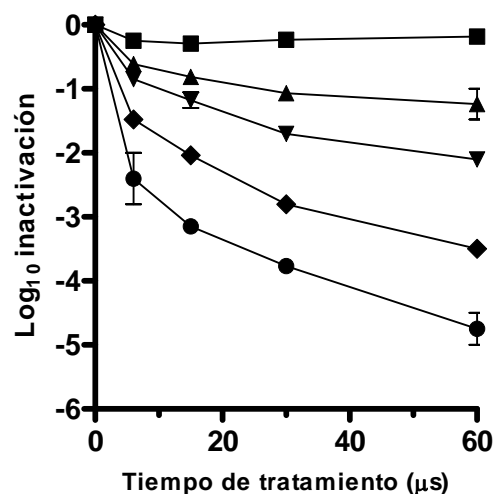


Figura 5.7. Gráficas de supervivencia correspondientes a la inactivación de *Salmonella* Typhimurium 878 por PEAV (30 kV/cm, 0.5 Hz, pulsos de onda cuadrada de 3 μ s) a diferentes temperaturas (4°C (■), 15°C (▲), 27°C (▼), 38°C (◆) y 50°C (●)) en tampón McIlvaine de pH 3.5.

Los resultados obtenidos con la cámara de tratamiento termostataada indican que la inactivación microbiana por PEAV depende en gran medida de la temperatura de tratamiento, incluso aunque ésta no sea letal para los microorganismos. La aplicación de tratamientos de PEAV a temperaturas superiores a la temperatura ambiente podría ser una estrategia apropiada para conseguir niveles de inactivación suficientes para garantizar la seguridad de los alimentos con tratamientos aplicables desde un punto de vista industrial. Por lo tanto, la temperatura de tratamiento, que generalmente hasta la fecha no se ha considerado como un factor crítico de

procesado en los estudios sobre la cinética de inactivación microbiana por PEAV, deberá de tenerse en cuenta en futuros estudios. En definitiva, se ha demostrado que la temperatura es un parámetro crítico que define los tratamientos por PEAV y que debería de incluirse en los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos mediante la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje.

5.3.2. Combinación de tratamientos de peav con antimicrobianos

Distintos autores han demostrado que la combinación de PEAV con distintos antimicrobianos, como nisina, lisozima, pediocina AcH o ácidos orgánicos es una estrategia eficaz para aumentar la eficacia letal de los tratamientos por PEAV (Dutreux *et al.*, 2000; Terebiznik *et al.*, 2000; Iu *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2000, 2001; Smith *et al.*, 2002; Ulmer *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2002, 2006; Gallo *et al.*, 2007; Somolinos *et al.*, 2007; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2008a). Sin embargo, no existía información sobre la influencia de estos antimicrobianos en el efecto letal de los PEAV a distintas temperaturas en medios de distinto pH. Con objeto de evaluar la posibilidad de utilizar compuestos antimicrobianos para mejorar la letalidad de los tratamientos por PEAV, se decidió investigar la inactivación de las cuatro cepas de microorganismos patógenos seleccionadas en presencia de nisina (100 y 200 ppm), en el rango de pH de la mayoría de los alimentos (3,5-7,0), a distintas temperaturas (4-50°C).

De entre los posibles antimicrobianos que podrían haberse investigado, se eligió la bacteriocina *nisina*, cuyo mecanismo de acción es similar al de los PEAV. La nisina es un péptido producido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que se caracteriza porque se une a la membrana citoplasmática de los microorganismos provocando la formación de poros y la salida del contenido intracelular (Delves-Broughton, 1990; Hurst y Hover, 1993). Aunque es conocido que la nisina no es efectiva frente a microorganismos Gram-negativos, debido a que su membrana externa impide la acción de la nisina sobre la membrana citoplasmática (Helander y Mattila-Sandholm, 2000), algunos autores habían indicado que la combinación de PEAV y nisina era también efectiva en microorganismos Gram-negativos (Boziaris *et al.*, 1998; Terebiznik *et al.*, 2000, 2002; Iu *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2002).

Debido a que el número de factores que se quería investigar era muy elevado, se recurrió a técnicas de diseño experimental para la planificación de los experimentos. Estas técnicas permiten establecer las condiciones experimentales necesarias para obtener el mínimo número de datos que se puedan analizar mediante métodos estadísticos, para así obtener conclusiones válidas y objetivas. Con objeto de conocer la influencia de los efectos individuales de cada uno de los factores investigados, así como de sus interacciones, e identificar aquellas combinaciones de factores que permitieran obtener una mayor inactivación, se utilizó el denominado diseño experimental de composición central.

En la Tabla 5.3 se muestran los modelos matemáticos obtenidos que estiman la inactivación microbiana que se obtiene con un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99 μ s) en función de la temperatura (T), del pH del medio de tratamiento (pH) y de la concentración de nisina (Nis). En todos los microorganismos, la relación entre la inactivación microbiana y los factores investigados se describe mediante ecuaciones polinomiales de segundo orden. En el caso de los microorganismos Gram-positivos, las ecuaciones incluyen como factores la temperatura (T), el pH (pH) y la nisina (Nis). En el caso de *L. monocytogenes* 5672, además aparece el término de la nisina elevado al cuadrado (Nis^2), y en el caso de *S. aureus* 4459, aparece el término pH elevado al cuadrado (pH^2) y el término nisina multiplicado por la temperatura ($Nis \cdot T$). En el caso de los microorganismos Gram-negativos, cabe destacar que en ninguna de las dos ecuaciones obtenidas aparece el término nisina (Nis). En la ecuación correspondiente a *Salmonella* Typhimurium 878, además de los términos temperatura (T) y pH (pH), aparece el término pH elevado al cuadrado (pH^2) y el término pH multiplicado por la temperatura ($pH \cdot T$), mientras que en el caso de *E.coli* O157:H7, además de los términos temperatura (T) y pH (pH) aparecen los términos pH elevado al cuadrado (pH^2) y temperatura elevado al cuadrado (T^2).

La aparición de términos elevados al cuadrado indican que el incremento de la inactivación al modificar la concentración de nisina en el caso de *L. monocytogenes* 5672 o el pH en el caso de *S. aureus* 4459 es no-lineal, mientras que la aparición de un término donde se multiplican dos factores indica que hay una interacción entre ellos, es decir, que la influencia de uno de ellos depende del valor que tiene el otro factor. Por otra parte, la ausencia del término nisina en las expresiones obtenidas para los dos microorganismos Gram-negativos indica que la presencia de nisina no influye

de manera significativa en el efecto letal de los PEAV a distintas temperaturas en medios de distinto pH. Esto indicaría que, incluso a temperaturas de 50°C, la membrana externa de los microorganismos Gram-negativos no se ve afectada por los tratamientos de PEAV. Estos resultados están en contradicción con los obtenidos por algunos autores que indican que la presencia de nisina incrementa el efecto letal de los pulsos eléctricos en algunos microorganismos Gram-negativos como *E. coli* o *Salmonella* (Boziaris *et al.*, 1998; Terebiznik *et al.*, 2000, 2002; McNamee *et al.*, 2010). Este diferente comportamiento podría ser debido a que se han utilizado otras cepas distintas de las investigadas en nuestro estudio o a que, como consecuencia del tratamiento de PEAV, se han alcanzado temperaturas superiores a los 50°C, que podrían afectar a la membrana externa y permitir que la nisina accediera a la membrana citoplasmática de los microorganismos Gram-negativos. Distintos autores han indicado que los tratamientos térmicos, incluso a temperaturas subletales, pueden afectar a la membrana externa de los microorganismos Gram-negativos (Boziaris *et al.*, 1998; Terebiznik *et al.*, 2000, 2002).

Tabla 5.3. Modelos matemáticos desarrollados para estimar la inactivación en los microorganismos investigados tras un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99 μ s) en función de la temperatura (entre 4 y 50°C), el pH del medio (entre 3,5 y 7,0) y la presencia de nisina (hasta 200 ppm).

Microorganismo	Modelo matemático
<i>E. coli</i> O157:H7 (Ec. 5.6)	$\text{Log } S = -12,84 - 0,015 \cdot T + 5,76 \cdot \text{pH} + 0,002 \cdot T^2 - 0,55 \cdot \text{pH}^2$
<i>Salmonella</i> Typhimurium 878 (Ec. 5.7)	$\text{Log } S = -10,33 + 0,11 \cdot T + 4,27 \cdot \text{pH} - 0,35 \cdot \text{pH}^2 - 0,009 \cdot T \cdot \text{pH}$
<i>L. monocytogenes</i> 5672 (Ec. 5.8)	$\text{Log } S = 3,01 + 0,07 \cdot T + 0,55 \cdot \text{pH} + 0,02 \cdot \text{Nis} - 0,000051 \cdot \text{Nis}^2$
<i>S. aureus</i> 4459 (Ec. 5.9)	$\text{Log } S = 0,03 + 0,05 \cdot T - 1,01 \cdot \text{pH} + 0,0066 \cdot \text{Nis} - 0,12 \cdot \text{pH}^2 + 0,00011 \cdot T \cdot \text{Nis}$

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

Los modelos desarrollados permitieron comparar la resistencia de las cuatro cepas resistentes de los microorganismos patógenos investigados tras un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99 μ s) en medios de distinto pH, como muestra la Figura 5.8 pero, además, a distintas temperaturas y cuando la nisina estaba presente en el medio de tratamiento. A modo de ejemplo, en la Figura 5.8, se muestra el número de ciclos de inactivación que se consiguen al aplicar el tratamiento de PEAV seleccionado a distintas temperaturas en medios de pH 3,5 y 7,0 sin nisina o en presencia de 100 ppm de nisina. Como la presencia de nisina no afectó a la sensibilidad de las células Gram-negativas, en ambas gráficas, para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium 878 solo se muestran las líneas correspondientes a su inactivación sin nisina. Se observa que, independientemente del pH o de la presencia de nisina, había una relación lineal entre la temperatura de tratamiento y los ciclos de inactivación conseguidos en todos los microorganismos, salvo en *E. coli* O157:H7. Este comportamiento ya se podría deducir de las ecuaciones mostradas en la Tabla 5.3 ya que solo en la ecuación de *E. coli* O157:H7 aparece el término temperatura elevado al cuadrado.

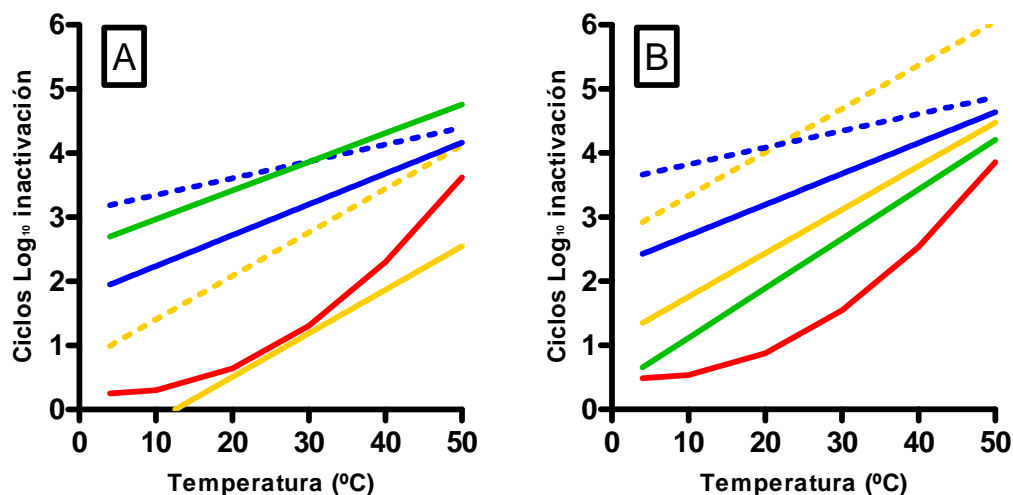


Figura 5.8. Influencia de la temperatura y la presencia (líneas discontinuas) o ausencia (líneas continuas) de nisina (100 ppm) en la inactivación estimada por los modelos matemáticos desarrollados para *E. coli* O157:H7 (Ec. 5.6) (líneas rojas), *Salmonella* Typhimurium 878 (Ec. 5.7) (líneas verdes), *L. monocytogenes* 5672 (Ec. 5.8) (líneas naranjas) y *S. aureus* 4459 (Ec. 5.9) (líneas azules) tras un tratamiento de PEAV (30kV/cm, 99 μ s) en tampón de pH 7,0 (A) y 3,5 (B).

En el medio de pH 7,0, cuando no se añadió nisina al medio de tratamiento en todo el rango de temperaturas investigado, las cepas de *Salmonella* Typhimurium 878 y *S. aureus* 4459 fueron las más sensibles al tratamiento, mientras que la más resistente fue la cepa de *L. monocytogenes* 5672. El incremento de la temperatura de tratamiento de 25°C, que se correspondía con la temperatura utilizada en el estudio cinético inicial (Figura 5.2), hasta 50°C aumentó el efecto letal del tratamiento entre 1 y 2 ciclos logarítmicos dependiendo del microorganismo. La presencia de nisina aumentó el efecto letal del tratamiento en los dos microorganismos Gram-positivos, especialmente en *L. monocytogenes* 5672. En este microorganismo, la presencia de 100 ppm de nisina incrementó el efecto letal del tratamiento alrededor de 1,5 ciclos logarítmicos para todas las temperaturas y a todos los pH investigados. Debido al aumento de la sensibilidad a los PEAV de los microorganismos Gram-positivos, cuando se añadió nisina al medio de tratamiento, el microorganismo más resistente a los PEAV fue la cepa de *E. coli* O157:H7.

En el medio de pH 3,5, en ausencia de nisina, las cepas más resistentes al tratamiento en todo el rango de temperaturas fueron las de los microorganismos Gram-negativos. El incremento de la resistencia a los PEAV de los microorganismos Gram-negativos y de la sensibilidad a los PEAV de los microorganismos Gram-positivos al disminuir el pH del medio de tratamiento ha sido observado previamente (García *et al.*, 2005d). Sin embargo, por primera vez, nuestros resultados muestran que este efecto es independiente de la temperatura de tratamiento (Figura 5.8). Hay que destacar que en el medio de pH 3,5, cuando se aplicó el tratamiento a 50°C la resistencia de las 4 cepas fue similar, en todos los casos la inactivación obtenida fue de entre 3 y 4 ciclos logarítmicos. La presencia de nisina también incrementó el efecto letal de los PEAV en la flora Gram-positiva en el medio de pH 3,5. A la temperatura más alta investigada (50°C), y en presencia de 100 ppm de nisina, se inactivaron 4,5 y 6 ciclos logarítmicos respectivamente la población de *S. aureus* 4459 y *L. monocytogenes* 5672.

Los zumos de frutas son unos de los alimentos más adecuados para ser procesados por la tecnología de los PEAV, ya que son productos cuyas propiedades sensoriales y nutritivas se ven afectadas por los tratamientos térmicos (Alwazeer *et al.*, 2002). Por otro lado, su bajo pH es una barrera muy eficaz para impedir la germinación la mayor parte de la flora esporulada resistente a los tratamientos de

PEAV (Ramaswamy y Abbatemarco, 1996). Tradicionalmente los zumos de frutas han sido considerados alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, debido a que los microorganismos patógenos no son capaces de multiplicarse a los bajos pH de los zumos de frutas. Sin embargo, en los últimos años se han producido distintos brotes de toxiinfecciones alimentarias causados por microorganismos patógenos como *Salmonella* spp o *E. coli* O157:H7 (Bull *et al.*, 2005). La capacidad de supervivencia de algunas cepas de microorganismos patógenos en medios de bajo pH y las bajas dosis infectivas necesarias para provocar una enfermedad en el consumidor, hacen necesario el uso de medidas de control de los microorganismos patógenos, especialmente en aquellos zumos de frutas que se comercializan sin pasteurizar y refrigerados. Los PEAV podrían ser una alternativa al procesado térmico para conseguir zumos de frutas seguros y con propiedades sensoriales y nutritivas similares a las de los zumos que se comercializan refrigerados sin pasteurizar térmicamente (Heinz *et al.*, 2003; Indrawati *et al.*, 2008; Soliva-Fortuny *et al.*, 2009). Además, como el tratamiento también inactiva a la flora vegetativa alterante, este proceso contribuiría a prolongar la vida útil de estos zumos (Dunn, 2001; Min *et al.*, 2003; Walking-Ribeiro *et al.*, 2010).

El pH de la mayoría de los zumos de fruta está comprendido entre 3,5 y 4,0 por lo que, según los resultados mostrados en la Figura 5.8, de los microorganismos estudiados, el más resistente en medios de este pH sería la cepa de *E. coli* O157:H7. La máxima inactivación obtenida en este microorganismo a la temperatura más alta investigada en el medio de pH 3,5 fue de 3,5 ciclos logarítmicos. Este nivel de inactivación todavía se puede considerar escaso para garantizar la seguridad de los alimentos, sobre todo si la comparamos con el requerimiento establecido por la FDA (2001), consistente en conseguir 5 ciclos logarítmicos de inactivación del microorganismo patógeno más resistente para la pasteurización de zumos de frutas. Con objeto de incrementar el efecto letal de los tratamientos de PEAV a distintas temperaturas, se consideró el uso de otro compuesto antimicrobiano, efectivo tanto frente a la flora Gram-positiva y como a la Gram-negativa, denominado etil lauroil arginato (LAE[®]). El LAE es una molécula con propiedades surfactantes con un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias, levaduras y mohos (Rodríguez *et al.*, 2004). Se trata de una molécula con carga positiva que se une a

compuestos con carga negativa de la membrana de los microorganismos, como algunas proteínas, provocando un incremento de la permeabilidad de la membrana.

La Figura 5.9 muestra la influencia de la presencia de LAE a concentraciones de 25 y 50 ppm en la inactivación de *E. coli* O157:H7 por un tratamiento de PEAV (30 kV/cm, 99 μ s) a diferentes temperaturas en un medio de pH 3,5. Se observa que, a 4°C, la inactivación obtenida tras el tratamiento de PEAV fue escasa incluso en presencia de LAE. Sin embargo, cuando el tratamiento se aplicó a 50 °C se obtuvieron más de 4 ciclos logarítmicos de inactivación con una concentración de LAE de 25 ppm y más de 5 ciclos logarítmicos con una concentración de LAE de 50 ppm. Por lo tanto, con la adición de este antimicrobiano, se podrían alcanzar los niveles de inactivación establecidos por la FDA para garantizar la seguridad de los alimentos en la cepa resistente de *E. coli* O157:H7 con un tratamiento de PEAV aplicable en la práctica desde un punto de vista industrial, a una temperatura de 50°C.

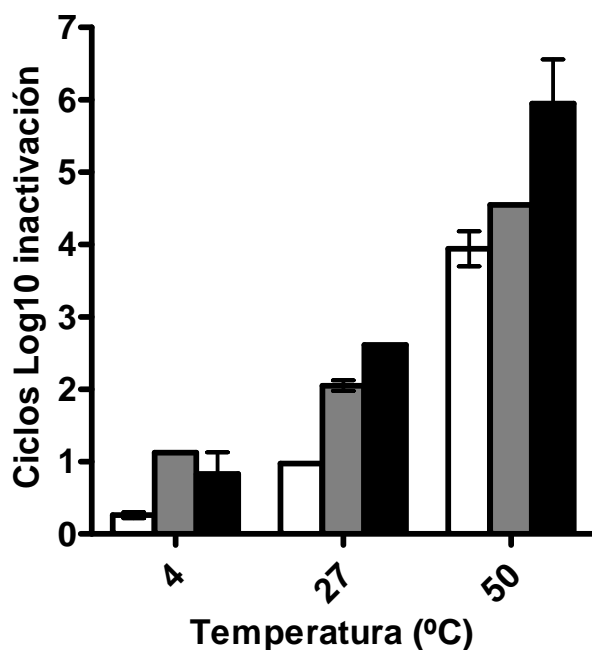


Figura 5.9. Influencia de la presencia de LAE en la inactivación de *E. coli* O157:H7 por PEAV (30 kV/cm, 100 μ s) a diferentes temperaturas (4, 27 and 50 °C). Medio de tratamiento: tampón McIlvaine de pH 3,5 (barras blancas), suplementado con 25 ppm de LAE (barras grises) o 50 ppm de LAE (barras negras).

5.4. VALIDACIÓN DE CRITERIOS DE PROCESADO PARA LA PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE MANZANA POR PEAV EN TRATAMIENTOS EN FLUJO CONTINUO

Las cámaras de tratamiento estáticas utilizadas para estudiar la resistencia microbiana a los PEAV se caracterizan porque permite trabajar con muestras de pequeño volumen y tener un estricto control de las condiciones de procesado (van den Bosch, 2007). El uso de este tipo de cámaras es recomendable cuando se quiere conocer con precisión la influencia de distintos parámetros en la resistencia microbiana a los PEAV ya que con ellas se evitan algunos artefactos metodológicos, que pueden tener una influencia importante en los resultados. Sin embargo, la aplicación industrial de los PEAV requiere la aplicación de tratamientos en flujo continuo, por lo que los resultados obtenidos en cámaras de tratamiento estáticas deben ser validados en tratamientos en flujo continuo antes de escalar la tecnología a un proceso productivo (Puértolas, 2010a).

En la literatura existen numerosos estudios sobre la inactivación microbiana por PEAV en sistemas de procesado en flujo continuo (Calderón-Miranda *et al.*, 1999a,b; Jin y Zhang, 1999; Mok y Lee, 2000; Heinz *et al.*, 2003; Evrendilek *et al.*, 2004a,b; Elez-Martínez *et al.*, 2005; Floury *et al.*, 2006; Mosqueda-Melgar *et al.*, 2007; San Martín *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios no han sido realizados con microorganismos patógenos de interés desde el punto de vista de la salud pública y no se han definido los criterios de procesado necesarios que deberían aplicarse para conseguir alimentos seguros pasteurizados por la tecnología de PEAV.

En los últimos años se ha producido un importante avance en el desarrollo de cámaras de tratamiento en flujo continuo, aspecto fundamental para poder utilizar la tecnología de los PEAV para aplicaciones industriales.

En el desarrollo de las cámaras de tratamiento ha jugado un papel decisivo el empleo de técnicas de simulación numérica. La aplicación exitosa de los PEAV en la industria alimentaria exige que se puedan conocer con precisión los valores de los parámetros de procesado críticos que determinan la eficacia de la tecnología. Las pequeñas dimensiones de las cámaras de tratamiento impiden la introducción en su interior de sondas de medida que, por otro lado, afectarían al flujo del producto, a la distribución del campo eléctrico y a la temperatura. Las técnicas de simulación

numérica permiten estimar la distribución espacial y temporal del campo eléctrico y la temperatura en función del flujo aplicado en las cámaras de tratamiento. Estas técnicas son muy útiles tanto para conocer los valores de los parámetros críticos de procesado que se están aplicando en el proceso en continuo como para diseñar las cámaras de tratamiento para conseguir un tratamiento lo más uniforme posible (Fiala *et al.*, 2001; Lindgren, 2001; Lindgren *et al.*, 2002; van den Bosch, 2007; Toepfl *et al.*, 2007b; Gerlach *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2009a; Puértolas, 2010b, 2011). Un ejemplo de la aplicación de estas técnicas de simulación numérica se muestra en la Figura 5.10, donde se compara la distribución del campo eléctrico en el interior de dos cámaras de tratamiento con dos configuraciones diferentes de los electrodos.

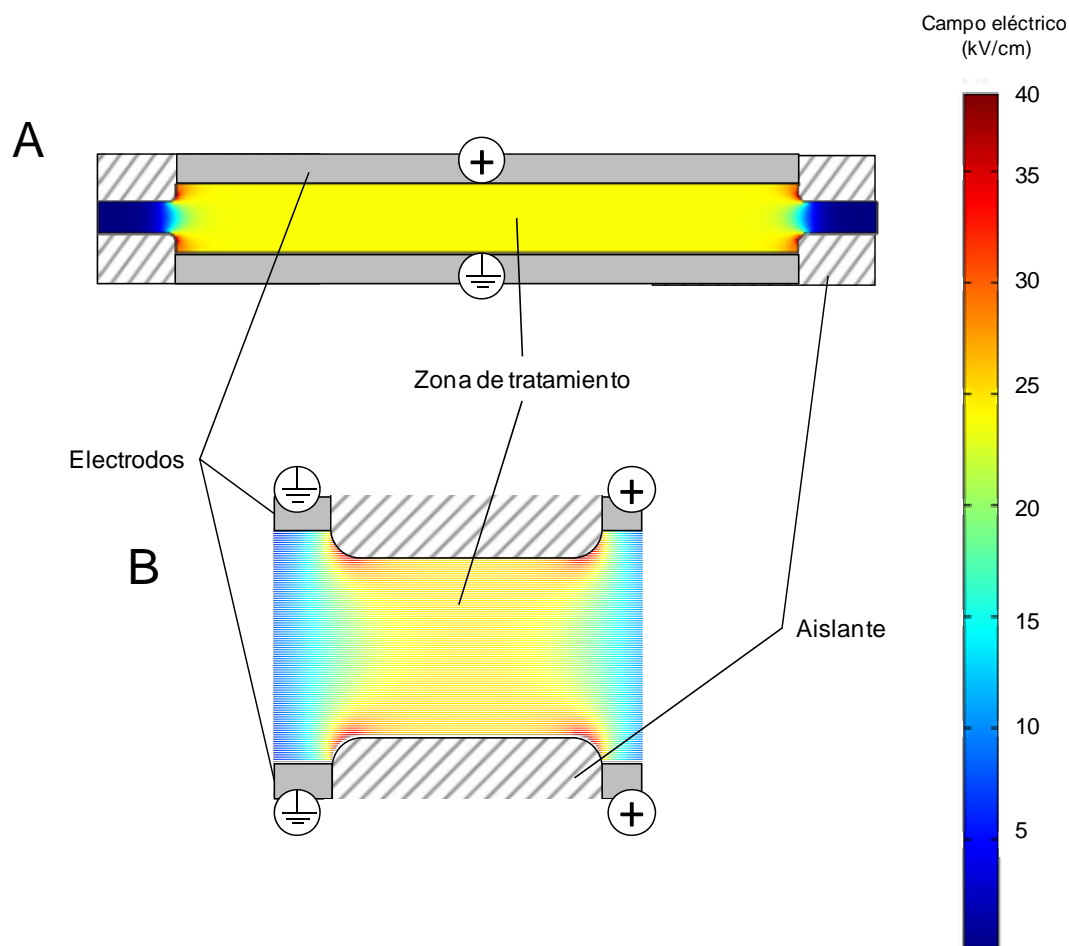


Figura 5.10. Simulación numérica de la intensidad del campo eléctrico en el interior de la zona de tratamiento de una cámara de electrodos paralelos en flujo continuo (A) y de una cámara colineal (B).

Desde el punto de vista del diseño de instalaciones, la cámara colineal, cuya sección al igual que la de las conducciones de la industria alimentaria, es circular, sería más adecuada que la de electrodos paralelos. Sin embargo, la distribución del campo eléctrico es mucho más uniforme en la cámara de tratamiento de electrodos paralelos (Jaeger *et al.*, 2009a). La uniformidad del tratamiento es fundamental para garantizar que todas las partes del alimento reciben la intensidad de tratamiento necesaria para conseguir el nivel de inactivación establecido para conseguir su pasteurización (Wouters *et al.*, 2001a). En caso de que el tratamiento no sea uniforme, se debería garantizar que todas las partes del alimento procesado reciban, al menos, la intensidad mínima requerida para conseguir un nivel de inactivación suficiente de los microorganismos patógenos, con objeto de conseguir un alimento seguro.

Atendiendo al criterio de uniformidad del tratamiento, los estudios realizados en esta Tesis Doctoral en flujo continuo se hicieron utilizando una cámara de tratamiento de electrodos paralelos.

Con objeto de evaluar la influencia de la temperatura y de la presencia de LAE en la eficacia de los PEAV en flujo continuo se investigó el efecto letal de los tratamientos de PEAV a tres intensidades campo eléctrico (20, 25 y 30 kV/cm) modificando la temperatura de entrada (20, 30, 35 y 40°C) sobre *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana sin LAE y con una concentración de LAE de 50 ppm. Con objeto de evitar posibles efectos térmicos en el efecto letal, el número de pulsos aplicado y, por lo tanto, la energía específica total de los tratamientos, se ajustaron para que la temperatura de salida del producto no superara los 60°C. En los procesos en flujo continuo, debido a que el tiempo de residencia del producto en la cámara de tratamiento es muy corto (inferior a 1 segundo), el producto al pasar por la cámara de tratamiento no intercambia calor con el entorno (proceso adiabático) por lo que se puede estimar la temperatura de salida del producto a partir de la temperatura de entrada y la energía específica total que recibe el producto en la propia cámara.

A partir de los resultados obtenidos se desarrollaron modelos matemáticos aplicando técnicas de regresión múltiple, y se obtuvieron dos ecuaciones de segundo grado, una para el tratamiento en zumo de manzana y otra para el tratamiento en

zumo de manzana a la que se le había añadido LAE. Estas ecuaciones permiten estimar la inactivación de *E. coli* O157:H7 tras un tratamiento de PEAV en flujo continuo en función de la intensidad del campo eléctrico (E), la temperatura inicial del producto (T) y el tiempo de tratamiento (t) (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Modelos matemáticos desarrollados para estimar la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana y zumo de manzana con 50 ppm de LAE a diferentes intensidades de campo eléctrico (20 - 30 kV/cm), temperaturas iniciales (20 - 40°C) y tiempos de tratamiento (hasta 124 μ s).

Medio de tratamiento	Modelo matemático
Zumo de manzana (Ec. 5.10)	$\text{Log } S = -2,41 + 0,09 \cdot E + 0,08 \cdot T + 0,19 \cdot t - 0,00027 \cdot t^2 - 0,0031 \cdot E \cdot T - 0,0068 \cdot E \cdot t - 0,0023 \cdot T \cdot t$
Zumo de manzana + 50ppm LAE (Ec. 5.11)	$\text{Log } S = -7,19 + 0,58 \cdot T + 0,25 \cdot t + 0,0059 \cdot E^2 - 0,067 \cdot T - 0,01 \cdot E \cdot T - 0,0099 \cdot E \cdot t - 0,0043 \cdot T \cdot t$

E: intensidad de campo eléctrico (kV/cm)

T: temperatura (°C)

t: tiempo de tratamiento (μ s)

A partir de los modelos desarrollados se pueden obtener gráficas como las que se muestran en las Figuras 5.11 y 5.12 para ilustrar la influencia de los factores investigados en la inactivación de *E. coli* O157:H7. En la Figura 5.11, se muestra la influencia de la intensidad del campo eléctrico y de la temperatura inicial en la inactivación de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana. Se observa que, tanto al aumentar la intensidad del campo eléctrico como la temperatura inicial de la suspensión, fue posible reducir el tiempo de tratamiento necesario para conseguir un determinado nivel de inactivación. Por ejemplo, al aumentar la temperatura de entrada del zumo de manzana en la cámara de tratamiento de 20 a 40°C, se redujo el tiempo de tratamiento para conseguir una inactivación de 3 ciclos logarítmicos de 117 a 50 μ s a una intensidad de campo eléctrico de 20 kV/cm. Por otro lado, cuando la temperatura de entrada fue de 30°C, el incremento de la intensidad de campo eléctrico de 20 a 30 kV/cm redujo el tiempo de tratamiento desde 78 a 30 μ s. Como consecuencia de la reducción del tiempo de tratamiento, también se redujo la energía específica total necesaria para obtener la inactivación de 3 ciclos logarítmicos. Por ejemplo para conseguir este nivel de inactivación se requería una energía específica

de 145 kJ/kg cuando el tratamiento se aplicó a 20 kV/cm y una temperatura de entrada del zumo de manzana de 20°C mientras que cuando el tratamiento se aplicó a 30 kV/cm y una temperatura inicial de 40°C sólo se requería una energía específica de 63 kJ/kg.

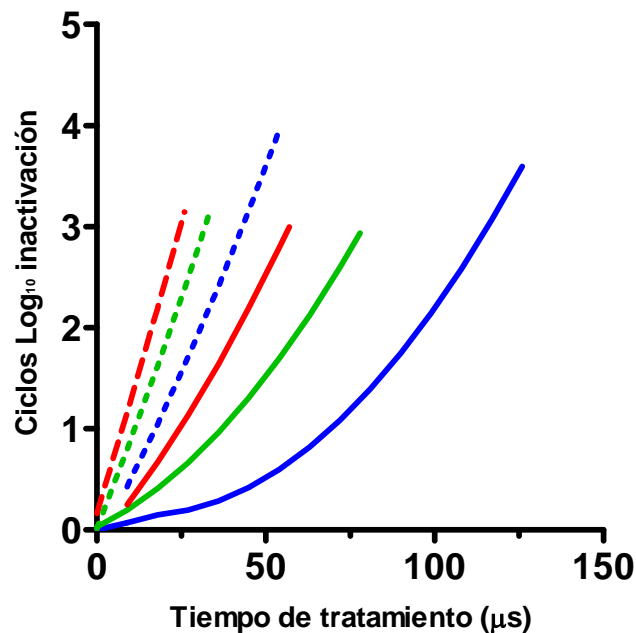


Figura 5.11. Influencia del campo eléctrico y la temperatura inicial en la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana estimada por la ecuación 5.10. Condiciones de tratamiento: intensidad de campo eléctrico de 20 kV/cm (líneas continuas) y 30 kV/cm (líneas discontinuas); temperaturas iniciales de 20°C (azul), 30°C (verde) y 40°C (rojo).

La Figura 5.12 muestra un ejemplo de la influencia de la presencia de LAE (50 ppm) en la inactivación de *E. coli* O157:H7 por un tratamiento de PEAV de 25 kV/cm a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento. La presencia de LAE también disminuyó el tiempo de tratamiento y, como consecuencia, la energía específica necesaria para obtener un determinado nivel de inactivación. Sin embargo, es incluso más destacable que, mientras que en ausencia de LAE la máxima inactivación obtenida era de entre 3 y 4 ciclos logarítmicos, en presencia de este agente antimicrobiano se obtuvieron niveles de inactivación superiores a los 6 ciclos logarítmicos aplicando los mismos tratamientos de PEAV.

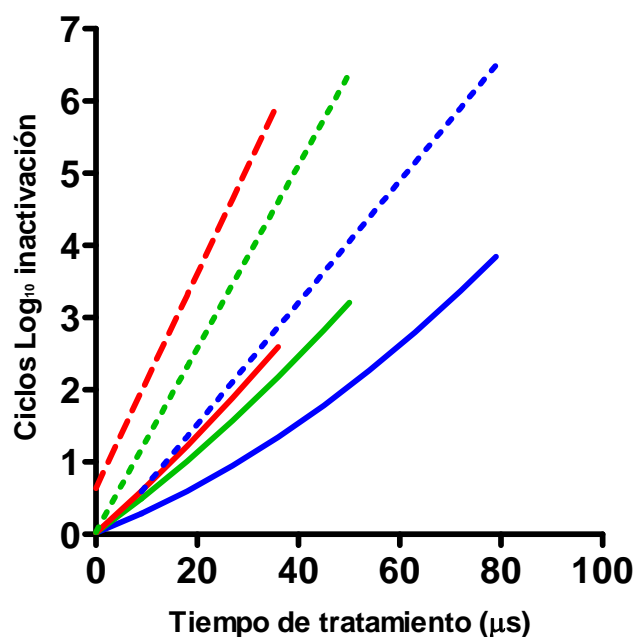


Figura 5.12. Influencia de la presencia de LAE (50 ppm) en la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 suspendido en zumo de manzana estimadas por las ecuaciones 5.10 y 5.11, a diferentes temperaturas iniciales. Condiciones de tratamiento: intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm; medio de tratamiento: zumo de manzana (líneas continuas) y zumo de manzana suplementado con 50 ppm de LAE (líneas discontinuas); temperaturas iniciales de 20°C (azul), 30°C (verde) y 35°C (rojo).

En las Figuras 5.13 A y B se muestran respectivamente el tiempo de tratamiento y la energía específica necesarios para obtener la reducción de 5 ciclos logarítmicos recomendada por la FDA (2001) en la población de *E. coli* O157:H7 suspendida en zumo de manzana con 50 ppm de LAE obtenidos a partir de la ecuación 5.11. En ellas se observa que el incremento de la intensidad del campo eléctrico o de la temperatura de entrada del zumo en la cámara de tratamiento redujo notablemente el tiempo de tratamiento necesario para obtener los 5 ciclos logarítmicos de inactivación. Sin embargo, independientemente de la temperatura inicial, el incremento de la intensidad de campo eléctrico en el rango de 20 a 25 kV/cm fue más efectivo en la reducción del tiempo de tratamiento que a intensidades de campo eléctrico superiores a 25 kV/cm (Figura 5.13A). Por otro lado, se observa que la temperatura inicial también tuvo una influencia significativa en la energía específica necesaria para conseguir los 5 ciclos logarítmicos de inactivación (Figura 5.13 B). Mientras que a bajas temperaturas de entrada, el consumo energético del

proceso se vió sustancialmente reducido al aumentar la intensidad del campo eléctrico hasta aproximadamente 25 kV/cm, a temperaturas superiores a los 30°C la intensidad del campo eléctrico no afectó a la energía específica requerida en el rango de 20 a 30 kV/cm. La menor energía específica requerida para alcanzar los 5 ciclos logarítmicos de inactivación en la población de *E. coli* O157:H7 fue de 60 kJ/kg, con una temperatura de entrada del zumo en la cámara de tratamiento de 35°C. Esta inactivación, con este consumo energético, se puede conseguir aplicando un tiempo de tratamiento de alrededor de 50 μ s si el tratamiento se aplica al menor campo eléctrico investigado, 20 kV/cm o de 20 μ s si el tratamiento se aplica a 30 kV/cm. Por lo tanto, este tipo de representaciones pueden resultar muy útiles para definir criterios de procesado para conseguir una inactivación equivalente. El uso de uno u otro criterio en la práctica industrial dependerá de las características del equipo disponible y de los costes energéticos del proceso.

Los primeros estudios en flujo continuo se realizaron con la cepa de *E. coli* O157:H7 ya que había sido demostrado en estudios previos con la cámara de tratamiento estática, que esta cepa era la más resistente a los tratamientos de PEAV aplicados a distintas temperaturas (Figura 5.8). Una vez demostrado que era posible

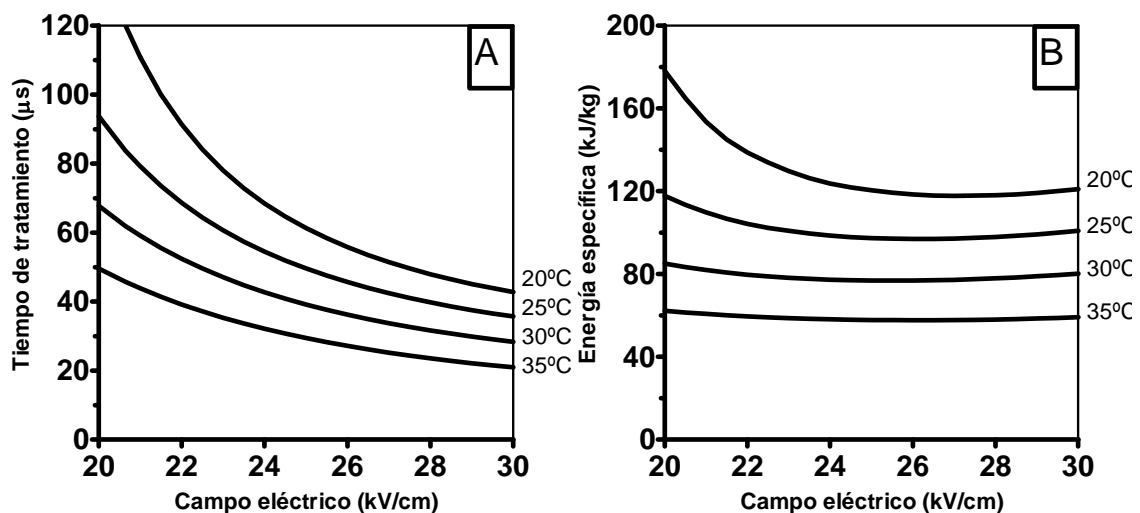


Figura 5.13. Estimación del tiempo de tratamiento (A) y energía específica requeridos para alcanzar 5 ciclos logarítmicos de inactivación en una suspensión de *E. coli* O157:H7 suspendida en zumo de manzana suplementado con 50 ppm de LAE a distintas intensidades de campo eléctrico y temperaturas iniciales. Los datos fueron estimados a partir de la ecuación 5.11.

conseguir al menos 5 ciclos logarítmicos de inactivación en este microorganismo aplicando tratamientos en flujo continuo (Figura 5.12), se decidió evaluar si estos tratamientos eran también eficaces para conseguir niveles de inactivación de la misma magnitud en las otras tres cepas de microorganismos patógenos resistentes a los PEAV utilizadas en esta investigación.

De acuerdo con las relaciones entre la intensidad del campo eléctrico, la temperatura inicial y el tiempo de tratamiento o la energía necesaria para conseguir 5 ciclos de inactivación en la población de *E. coli* O157:H7, que se muestra en la Figura 5.13, las condiciones de tratamiento seleccionadas para evaluar la inactivación en las cepas de *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459 y *Salmonella* Typhimurium 878 fueron una intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm y una temperatura inicial de tratamiento de 35°C. Con estas condiciones, se conseguía la inactivación establecida, en *E. coli* O157:H7, con el mínimo consumo energético (60 kJ/kg) y aplicando un tiempo de tratamiento no muy prolongado, 30 μ s, que se corresponden con 10 pulsos de 3 μ s. Aunque la aplicación del tratamiento a 30 kV/cm permitía obtener la misma inactivación con un tiempo de tratamiento más corto, se decidió trabajar a una intensidad de campo eléctrico menor (25 kV/cm) que sería más adecuada para la aplicación de los procesos a escala industrial. Cuanto menor es el campo eléctrico, se requiere generadores de PEAV menos potentes o se puede procesar más cantidad de producto por unidad de tiempo con la misma potencia. Por otro lado, al reducir la intensidad de campo eléctrico, disminuye el riesgo de que se produzcan arcos eléctricos en el interior de la cámara de tratamiento.

En la Figura 5.14 se muestran los ciclos logarítmicos de inactivación conseguidos al aplicar el tratamiento seleccionado (25 kV/cm, temperatura inicial de 35°C) a tres tiempos de tratamiento diferentes, que se correspondían con temperaturas de salida de 45, 50 y 55°C, en las otras tres cepas suspendidas en zumo de manzana y zumo de manzana suplementado con 50 ppm de LAE. A efectos comparativos, en la Figura 5.14, se han incluido los resultados obtenidos para la cepa de *E. coli* O157:H7. Cuando los tratamientos se aplicaron en el zumo de manzana, sólo se consiguió una inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en la cepa de *L. monocytogenes* 5672 cuando la temperatura de salida fue de 55°C. Aunque *L. monocytogenes* 5672 fue identificada como la cepa más resistente a los tratamientos de PEAV a temperaturas alrededor de 25°C en tampón de pH similar al pH del zumo

de manzana (Figura 5.3), fue la más sensible al tratamiento de PEAV en continuo. Este comportamiento se puede atribuir a que el incremento de la temperatura de tratamiento tiene un efecto sensibilizante frente a los PEAV, mayor en la cepa de *L. monocytogenes* 5672 que en las otras tres cepas investigadas. Cuando se añadió LAE al zumo de manzana, se obtuvo una inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en la cepa de *Salmonella* Typhimurium 878 a una temperatura de salida de 45°C y en todas las cepas investigadas, excepto en la cepa de *S. aureus* 4459, a una temperatura de salida de 50°C. Cuando la temperatura de salida fue de 55°C, fue posible lograr una inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en las 4 cepas resistentes a los PEAV. Para conseguir una inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos en el zumo de manzana sin añadir LAE, fue necesario incrementar la temperatura de tratamiento hasta 60°C en las cepas de *L. monocytogenes* 5672, *S. aureus* 4459 y *Salmonella* Typhimurium y hasta 65°C en la cepa de *E. coli* O157:H7 (datos no mostrados).

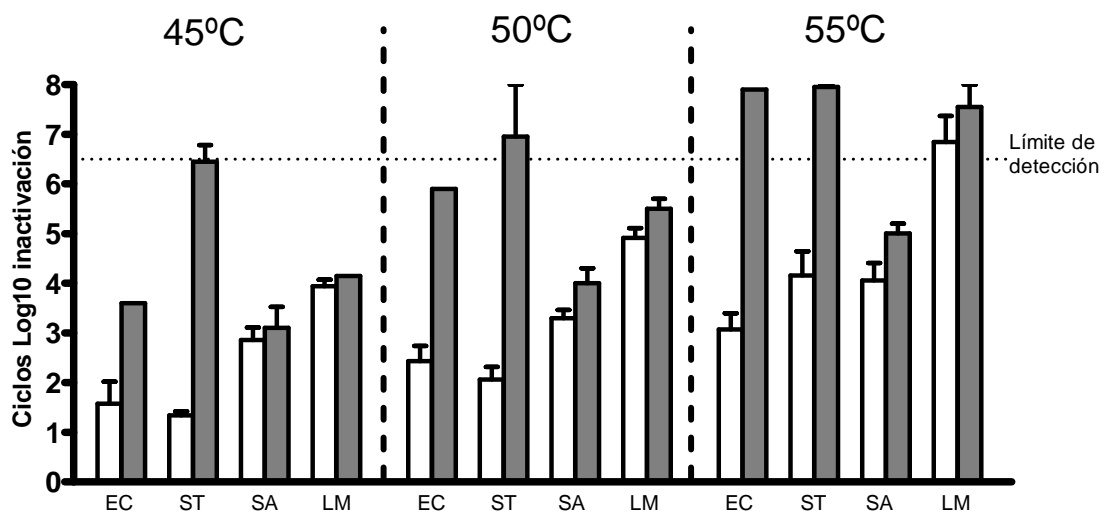
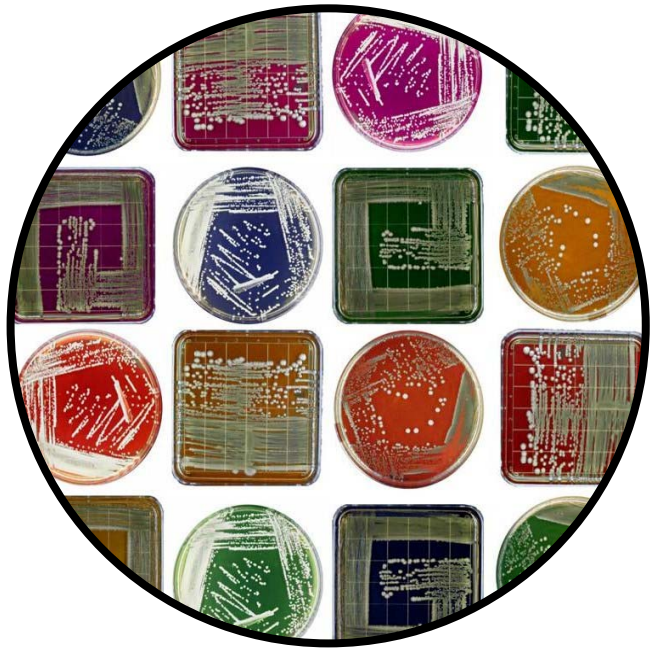


Figura 5.14. Inactivación de *E. coli* O157:H7 (EC), *Salmonella* Typhimurium 878 (ST), *S. aureus* 4459 (SA) y *L. monocytogenes* 5672 (LM) suspendidos en zumo de manzana (barras blancas) y zumo de manzana con 50 ppm de LAE (barras grises) tras aplicar tratamientos de PEAV (25 kV/cm) a una temperatura inicial de 35°C y diferentes temperaturas finales (45, 50 y 55°C).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este Tesis Doctoral han demostrado que la combinación de un tratamiento de PEAV con temperaturas moderadas es una estrategia adecuada que permite definir los criterios de procesado para conseguir

reducir la población de 4 cepas de microorganismos patógenos, especialmente resistentes a los PEAV, al menos 5 ciclos logarítmicos. La consecución de este nivel de inactivación requiere incrementar la temperatura de salida del producto hasta los 65°C. Aunque esta temperatura está próxima a las que se utilizan en algunos tratamientos térmicos, el tiempo de residencia (0,8 segundos) es mucho menor que el utilizado cuando se procesan alimentos a estas temperaturas. Aunque es un aspecto a investigar, es esperable que este corto tiempo de tratamiento no afecte a las propiedades sensoriales y nutritivas del producto. La instalación de un sistema de reaprovechamiento de energía para precalentar el producto sin tratar, con el que sale tras el tratamiento, podría permitir compensar el incremento del consumo energético del proceso debido a la necesidad de introducir el producto a temperaturas superiores a la temperatura ambiente (35°C) (Heinz *et al.*, 2003; Toepfl *et al.*, 2006). La adición del agente antimicrobiano LAE, efectivo tanto en microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos, permite conseguir niveles de inactivación superiores a los 5 ciclos logarítmicos con una temperatura de salida menor (55°C) y, en consecuencia, con tratamientos de PEAV más cortos y de un menor consumo energético. Por lo tanto, la adición de LAE al producto sería una alternativa eficaz si una temperatura de salida de 65°C afectase a la calidad sensorial o nutricional del producto, o si se quisiera disminuir el coste energético del proceso.

6. CONCLUSIONES



1. La resistencia microbiana a los PEAV y la existencia de daño subletal varió considerablemente entre las 20 cepas de las 4 especies bacterianas patógenas investigadas en esta Tesis Doctoral, en función del pH del medio de tratamiento. Las cepas más resistentes de cada una de las 4 especies bacterianas investigadas, seleccionadas para establecer los criterios de procesado para la pasteurización de los alimentos, fueron *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium 878, *L. monocytogenes* 5672 y *S. aureus* 4459.
2. El desarrollo de modelos matemáticos terciarios a partir de la descripción de las correspondientes gráficas de supervivencia, con un modelo basado en la distribución de Weibull, permitió comparar la resistencia de las 4 cepas seleccionadas en un amplio rango de intensidades de campo eléctrico (15-35 kV/cm) y tiempos de tratamiento (hasta 501 μ s) en el rango de pH de la mayoría de los alimentos (3,5-7,0).
3. El nivel de inactivación obtenido en las cepas más resistentes al tratamiento de PEAV, en condiciones de tratamiento aplicables en flujo continuo en un proceso industrial, a temperatura ambiente, fue insuficiente para garantizar la pasteurización de los alimentos. Estos resultados indican la necesidad de combinar los PEAV con otros factores para conseguir un nivel de inactivación suficiente para alcanzar este objetivo.
4. Se diseñó y evaluó una cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos termostatados, que permitió obtener, por primera vez, datos cinéticos de inactivación microbiana por PEAV en un amplio rango de temperaturas (4-50°C) en condiciones prácticamente isotérmicas.
5. La inactivación microbiana por PEAV dependió de la temperatura de tratamiento, incluso a temperaturas no letales para los microorganismos. Por lo tanto, la temperatura de tratamiento debe considerarse como un factor crítico de procesado en los futuros estudios sobre la resistencia microbiana a los PEAV.
6. La aplicación de técnicas de diseño experimental permitió investigar el efecto combinado de los PEAV y la presencia de nisina en un amplio rango de temperaturas y pH del medio de tratamiento sobre las 4 cepas

seleccionadas resistentes a los PEAV. La presencia de nisina en el medio de tratamiento tuvo un efecto aditivo o ligeramente sinérgico en la inactivación por PEAV de las dos cepas Gram-positivas, mientras que este antimicrobiano no aumentó la letalidad de los PEAV en las cepas Gram-negativas.

7. La presencia del antimicrobiano N^o-lauroil etilester (etil lauroil arginato, LAE) aumentó la letalidad de los tratamientos de PEAV tanto en las cepas de los microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos.
8. La combinación de los PEAV con temperaturas moderadas permitió definir criterios de procesado aplicables a escala industrial para conseguir reducir la población de las 4 cepas más resistentes de cada una de las especies bacterianas patógenas investigadas, al menos 5 ciclos logarítmicos, en zumo de manzana. Este nivel de inactivación se consiguió con un tiempo de residencia en la cámara de tratamiento de 0,8 segundos, aplicando una intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm, con una temperatura de entrada del producto en la cámara de tratamiento de 35°C y de salida de 60°C (110 kJ/kg) en las cepas de *Salmonella* Typhimurium 878, *L. monocytogenes* 5672 y *S. aureus* 4459. Para *E. coli* O157:H7 fue necesario una temperatura de salida de 65°C (125 kJ/kg).
9. En presencia de 50 ppm de LAE en el zumo de manzana, un tratamiento con un tiempo de residencia de 0,8 segundos, de una intensidad de campo eléctrico de 25 kV/cm, con una temperatura de entrada del producto en la cámara de tratamiento de 35°C y de salida de 55°C (83,2 kJ/kg) fue suficiente para conseguir un nivel de inactivación de al menos 5 ciclos logarítmicos en la población de las 4 cepas más resistentes de cada una de especies bacterianas patógenas investigadas.

7. BIBLIOGRAFÍA



- Abdoul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS**, 1993. Survival and growth of *Esherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1999-2006.
- Abidor IG, Arakelyan LV, Chernomordik LV, Chizmadzhev Y, Pastushenko VF, Tarasevich MR**, 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membrane. I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 6, 37-52.
- Advisory Committee on Microbiological Safety of Food (ACMSF)**, 1992. Report on Vacuum Packaging and Associated Processes. London: HMSO.
- Ade-Omowaye BIO, Angersbach A, Taiwo KA, Knorr D**, 2001. Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science and Technology* 12, 285-295.
- Aguiló-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O**, 2008. Comparative study on color, viscosity and related enzymes of tomato juice treated by high intensity pulsed electric fields or heat. *European Food Research and Technology*, 227 (2), 599-606.
- Ahn J, Balasubramaniam VM, Youself AE**, 2007. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *International Journal of Food Microbiol.* 113 (3), 321-329.
- Alkhafaji SR, Farid M**, 2007. An investigation on pulsed electric fields technology using new treatment chamber design. *Innovative Food Science and Emerging technologies* 8, 205-212.
- Allen M, Soike K**, 1966. Sterilization by electrohydraulic treatment. *Science* 154, 155-157.
- Altuntas J, Evrendilek GA, Sangun MK, Zhang HQ**, 2010. Effects of pulsed electric field processing on the quality and microbial inactivation of sour cherry juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 899-905.

- Álvarez I, Raso J, Palop A, Sala FJ, 2000. Influence of factors on the inactivation of *Salmonella Senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 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 in Applied Microbiology* 35, 489-493.
- Álvarez I, Mañas P, Condón S, Raso J, 2003a. Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *Journal of Food Science* 68, 2316-2320.
- Álvarez I, Raso J, Sala FJ, Condón S, 2003b. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology* 20, 691-700.
- Álvarez I, 2003c. *Inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
- Álvarez I, Pagán R, Condón S, Raso J, 2003d. 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, Virto R, Raso J, Condón S, 2003e. Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 195-202.
- Álvarez I, Condón S, Raso J, 2006. Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 97-129). Springer: Nueva York.
- Álvarez I, Heinz V, 2007. Hurdle technology and the preservation of food by Pulsed Electric Fields. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food Preservation by Pulsed Electric Fields. From Research to Application* (pp. 165-175). Woodhead Publishing: Cambridge.

- Alwazeer D, Cachon R, Divies C**, 2002. Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice, *Journal of Food Protection* **65**, 1586–1589.
- Amiali M, Ngadi MO, Raghavan VGS, Smith JP**, 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in liquid dialyzed egg using pulsed electric fields. *Food and Bioproducts Processing* **82**, 151-156.
- Amiali M, Ngadi MO, Raghavan GSV, Smith JP** 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg white using pulsed electric field. *Journal of Food Science* **71**, 88–94.
- Amiali M, Ngadi MO, Smith JP, Raghavan GSV**, 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering* **79**, 689–694.
- Anónimo - National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food (NACMCF)**, 1997. Recommendations for Controlling the Transmission of Pathogenic Microorganisms in Juices. *Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture*, Washington, DC.
- Anónimo**, 2002. *Salmonella* Annual Summary. (2002). Atlanta, Georgia 30333: Department of Health and Human Services – Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. *Foodborne and Diarrheal Diseases Branch*.
- Arnoldi A**, 2002. Thermal processing and nutritional quality. In Henry, C. J. K., Chapman, C. (Eds.). *The Nutrition Handbook for Food Processing* (pp. 265-286). Cambridge: Woodhead.
- Aronsson K, Rönner U**, 2001. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2**, 105-112.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 99, 19-32.

Arroyo C, Somolinos M, Cebrián G, Condón S, Pagán 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, 525-531.

Augustin JC, Carlier V, Rozier J, 1998. Mathematical modelling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 84, 185-191.

Baer Ef, Duran AP, Leininger HV, Read RB Jr, Schwab AH, Swartzentruber A, 1976. Microbiological quality of frozen breaded fish and shellfish products. *Applied Environmental Microbiology* 31, 337-341.

Bahk J, Yousef AE, Marth EH, 1990. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. *LWT* 23, 66-69.

Baird-Parker TC, 1990. The staphylococci – an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium supplement: 1S-8S.

Baird-Parker TC, 2000. *Staphylococcus aureus*. En Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW (eds.), *The microbiological safety and quality of foods* (pp. 1317-1335). Aspen Publishers: Gaithersbourg.

Baranyi J, Pin C, Ross T, 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48, 159-166.

Barber MA, 1914. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udders of cow. *Philippine Journal of Science* section B9, 515-519.

Barbosa-Cánovas GV, Pothakamury UH, Palou E, Swanson BG, (Ed.) 1998. *Nonthermal preservation of foods*. Marcel Dekker, Inc, New York.

Barbosa-Cánovas GV, Góngora-Nieto MM, Pothakamury UR, Swanson BG, 1999. PEF induced biological changes. En SL Taylor (Ed.), *Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields* (pp. 76-107). Academic Press: San Diego.

- Barbosa-Cánovas GV, Pierson MD, Zhang QH, Schaffner DW, 2001.** *Pulsed electric fields. Journal of Food Science*, 65–79 Supplement.
- Barbosa-Cánovas GV, Tapia MS, Cano MP, 2005.** *Novel Food Processing Technologies*. Boca Raton: Marcel Dekker/CRC Press.
- Barbosa-Cánovas GV, Altunakar B, 2006.** Pulsed Electric Fields Processing of Foods: An Overview. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 3-21). Springer: Nueva York.
- Barnett A, Weaver JC, 1991.** A unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and rupture. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 25, 163-182.
- Barsotti L, Cheftel JC, 1999.** Food processing by pulsed electric fields. 2. Biological aspects. *Food Reviews international* 15, 181-213.
- Bazhal MI, Ngadi MO, Raghavan GSV, Smith JP, 2006.** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments. *LWT - Food Science and Technology* 39, 419-425.
- Beattie JM, Lewis FC, 1925.** The electric current (apart from the heat generated) a bacteriological agent in the sterilization of milk and other fluids. *Journal of Hygiene* 24, 123-137.
- Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T, Mackey B. 1999.** Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1564–1569.
- Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barret TJ, Wells JG, Griffin PM, 1993.** An outbreak of diarrhea and haemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed cider. *JAMA* 269, 2217-2220.
- Beveridge JR, MacGregor SJ, Marsili L, Anderson JG, Rowan NJ, Farish O, 2002.** Comparison of the effectiveness of biphasic and monophasic rectangular pulses for the inactivation of microorganisms using pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science* 30, 1525-1531.

- Blackburn C, McClure P**, 2002. Introduction. En Blackburn C, McClure P, (eds.). *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control* (pp 3-10). Cambridge:Woodhead.
- Boziaris IS, Humpheson L, Adams MR**, 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43, 7-13.
- Brown BE**, 1997. Thermal process-development, validation, adjustment and control. En *Food Canning Technology*, pp. 1852-1885. Ed. J. Larousse. New York: Wiley-VCH.
- Buckow R, Schroeder S, Berres P, Baumann P, Knoerzer K**, 2010. Simulation and evaluation of pilot-scale pulsed electric field (PEF) processing. *Journal of Food Engineering*, 100, 67-77.
- Buckow R, Baumann P, Schroeder S, Knoerzer K**, 2011. Effect of dimensions and geometry of co-field and co-linear pulsed electric field treatment chambers on electric field strength and energy utilization. *Journal of Food Engineering*, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.03.019.
- Budd W**, 1974. *Typhoid Fever. Its nature, modes of spreading and prevention*. Arno Press: New York.
- Bull MK, Szabo EA, Cole MB, Stewart CM**, 2005. Toward validation of process criteria for high-pressure processing of orange juice with predictive models. *Journal of Food Protection* 68, 949-54.
- Bushnell AH, Dunn JE, Clark RW**, 1993. *High pulsed voltage system for extending the shelf life of pumpable food products*. Patente N° US 5048404, EE.UU.
- Calderón-Miranda ML, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1999a. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 51, 19-30.

- Calderón-Miranda M L, Barbosa-Cánovas G V, Swanson B G** 1999b. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 51, 7–17.
- Castro AJ, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1993. Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation* 17, 47-73.
- Cebrián G, Sagarzazu N, Pagan R, Condon S, Mañas P**, 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology* 118, 304-311.
- 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.
- Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E**, 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, 111, 439–447.
- Chen HQ**, 2007. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food Microbiology*. 24 (3),197-204.
- Chernomordik LV, Sukharev SI, Popov SV, Pastushenko VF, Sokirko AV, Abidor IG, Chizmadzhev YUA**, 1987. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochimica et Biophysica Acta* 902, 360–373.
- Christensen ER, Chen DX, Nyholm N, Kusk KO**, 2001. Joint action of chemicals in algal toxicity tests: influence of response level and dose-response regression model. *Environmental and Toxicology Chemistry* 20 (10), 2361-2369.
- Clarck P**, 2006. Pulsed electric field processing. *Food Technology* 60, 66-67.
- Cody SH, Glynn MK, Farrar JA, Cairns KL, Griffin PM, Kobayashi J, Fyfe M, Hoffman R, King AS, Lewis JH, Swaminathan B, Bryant RG, and Vugia**

- DJ**, 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine* 130 (3), 202-209.
- Cole MB, Davies KW, Munro G, Holyoak CD, Kilsby DC**, 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 232-239.
- Condón S, Palop A, Raso J, Sala F**, 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters of Applied Microbiology* 22, 149-152.
- Conner DE, Brackett RE, Beuchat LR**, 1986. Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Applied Environmental Microbiology* 52 (1), 59-63.
- Conner DE, Scott VN, Bernard DT**, 1990. Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food Protection* 53 (6), 1553-1556.
- Cortés C, Esteve MJ, Frígola A**, 2008. Effect of refrigerated storage on ascorbic acid content of orange juice treated by pulsed electric fields and thermal pasteurization. *European Food Research and Technology*, 227 (2), 629-635.
- Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B**, 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 85-91.
- Coster HGL, Zimmermann U**, 1975. The mechanisms of electrical breakdown in the membrane of *Valonia utricularis*. *Journal of Membrane Biology* 22, 73-90.
- Couvert O, Gaillard S, Savy N, Mafart P, Leguérinel I**, 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology* 101, 73-81.
- Craven HM, Swigeron P, Ng S, Midgely J, Versteeg C, Coventry MJ, Wan J**, 2008. Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for

- inactivation of pseudomonads and enhancement of milk shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 211–216.
- Crowley JM**, 1973. Electrical breakdown of biomolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophysics Journal* 13, 711-724.
- Cserhalmi Z, Vidács I, Beczner J, Czukor B**, 2002. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 41-45.
- D'Aoust JY**, 1989. *Salmonella* (pp. 327-445). En Doyle, MP. (ed), *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker: New York.
- da Cruz AG, Fonseca-Faria JDA, Isay-Saad SM, André-Bolini HM, SantAna AS, Cristianini M**, 2010. High pressure processing and pulsed electric fields: Potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 483-493.
- Dack GM, Cary WE, Woolpert O, Wiggins HJ**, 1930. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow haemolytic staphylococcus. *Journal of Preventive Medicine* 4, 167-175.
- Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM**, 1974. pH and buffers. En Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM (eds.), *Data for biochemical research* (pp. 475-508). Clarendon Press: Oxford.
- de Haan SWH, Willcock PR**, 2002. Comparison of the energy performance of pulse generation circuits for PEF. *Innovative in Food Science and Emerging Technologies* 3, 349-356.
- de Haan, SWH**, 2007. Circuitry and pulse shapes in pulsed electric field treatment of food. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 43-69). Woodhead Publishing: Cambridge.
- de Jong P, van Heesch EJM**, 1998. Review: Effects of pulsed electric fields on the quality of food products. *Milchwissenschaft* 53, 4-8.

- de Valk H, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, Perra A, Simon F, Desenclos JC, Martín P**, 2005. Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Euro Surveillance* 10 (10), 251-255.
- Delves-Broughton J**, 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology* 44, 100–112.
- Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J**, 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International of Dairy Journal*, 14, 273–285.
- Dimitrov DS**, 1984. Electric field induced breakdown of lipid bilayers and cells membranes: A thin viscoelastic model. *Journal of Membrane Biology* 78, 53-60.
- Doevenspeck H**, 1960. *Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen Systemen*. Patente N° DE 1237541, Alemania.
- Dorronsoro I, Martín C, Ojer M, Ruz A**, 1998. Evolución de las gastroenteritis bacterianas. Hospital de Navarra: 1995-1998. En *Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Libro de Ponencias, comunicaciones y posters*. 93, Universidad Pública de Navarra (ed.) Pamplona.
- Doyle MO**, 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 12, 289-302.
- Duffy S, Schaffner DW**. 2001. Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider using probability distribution functions for quantitative risk assessment. *Journal of Food Protection* 64, 599-605.
- Dunn JE, Pearlman JS**, 1987. *Methods and apparatus for extending the self life of fluid food products*. Patente N° US 4695472, EE.UU.
- Dunn JE**, 2001. Pulsed electric field processing: an overview. En GV Barbosa-Cánovas, QH Zhang (Eds.), *Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 1-30). Technomic Publishing: Lancaster.

- Dutreux N, Notermans S, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 2000. Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 60, 147-152.
- Edebo L, Selin I**, 1968. The effect of the pressure shock wave and some electrical quantities in the microbicidal effect of transient electric arcs in aqueous system. *Journal of General Microbiology* 50, 253-259.
- El-Belghiti K, Vorobiev E**, 2004. Mass transfer of sugar from beets enhanced by pulsed electric field. *Food and Bioproducts Processing* 82, 226-230.
- El-Hag AH, Dadarwal R, Gonzalez OR, Jayaram SH, Griffiths MW**, 2010. Survivability of inoculated versus naturally grown bacteria in apple juice under pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 46 (1), 9-15.
- El-Hag AH, Jayaram SH, Griffiths MW**, 2006. Inactivation of naturally grown microorganisms in orange juice using pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34 (4 II), 1412-1415.
- Elez-Martínez P, Escolà-Hernández J, Soliva-fortuny R, Martín-Belloso O**, 2005. Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. *Food Microbiology* 22, 311-319.
- Esplugas S, Pagán R, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 2001. Engineering aspects of the continuous treatment of fluid foods by pulsed electric fields. En GV Barbosa-Cánovas, QH Zhang (Eds.), *Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 31-45). Technomic Publishing: Lancaster.
- European Food Safety Authority, E.C.f.D.P.a.C.** 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, *Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006* *The EFSA Journal* 130.
- European Food Safety Authority (EFSA)**, 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008, *The EFSA Journal*, 1496.

- Everson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS,** 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* 7, 311-316.
- Evrendilek GA, Zhang QH, Richter ER,** 1999. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* 8739 in apple juice by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 62, 793–796.
- Evrendilek GA, Jin ZT, Ruhlman KT, Qiu X, Zhang QH, Richter ER,** 2000. Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1, 77-86.
- Evrendilek GA, Zhang QH, Richter ER,** 2004a. Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering* 87 (2), 137–144.
- Evrendilek GA, Li S, Dantzer WR, zhang QH,** 2004b. Pulsed Electric Field Processing of Beer: Microbial, Sensory, and Quality Analyses. *Journal Of Food Science* 68 (8), 228-232.
- Evrendilek GA, Zhang QH,** 2005. Effects of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields-induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Engineering* 68, 271–276.
- Eynard N, Rodriguez F, Trotard J, Teissié J,** 1998. Electrooptics Studies of *Escherichia coli* Electropulsation: Orientation, Permeabilization, and Gene Transfer. *Biophysical Journal* 75, 2587–2596.
- Farber JM, Sanders GW, Johnston MA,** 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *Journal of Food Protection* 57 (7), 456-458.
- Farber JM, Peterkin PI,** 2000. *Listeria monocytogenes*. En Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (pp. 1178-1216). Aspen Publishers, Inc.: Maryland.

- Fedio WM, Jackson H**, 1989. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 9, 157-160.
- Felsenfeld O, Young VM**, 1945. The viability of *Salmonella* on artificially contaminated vegetables. *Poultry Science* 24, 253-255.
- Fernandez-Molina JJ, Barbosa-Canovas GV, Swanson B G**, 2001. Inactivation of *Listeria innocua* by combining pulsed electric fields and acetic acid in skim milk. *Book of abstracts of the 2001 IFT Annual Meeting*, New Orleans, June 2001, LA, 23–27.
- Ferziger JH, Peric M**, 2002. *Computational methods for fluid dynamics*. Springer: Berlín.
- Fetterman JC**, 1928. The electrical conductivity method of processing milk. *Agricultural Engineering* 9, 107-108.
- Fiala A, Wouters PC, van den Bosch E, Creighton YLM**, 2001. Coupled electrical-fluid model of pulsed electric field treatment in a model food system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2, 229-238.
- Field M**, 1979. Mode of Action of enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Reviews of Infectious Disease* 1, 918-925.
- Fleischman GJ, Ravishankar S, Balasubramaniam**, 2004. The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology* 21, 91-95.
- Floury J, Grosset N, Lesne E, Jeantet R**, 2006. Continuous processing of skim milk by a combination of pulsed electric fields and conventional heat treatments: does a synergetic effect on microbial inactivation exist? *Lait* 86, 203–211.
- Food and Drug Administration (FDA)**, 1997. Milk and cream, pasteurized (21 CFR 131.3b). *Code of Federal Regulations*, U.S. Government Printing Office, Washington. DC.

- Food and Drug Administration (FDA)**, 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP) procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. *Federal Register*, 66, FR 6137-6202.
- Food and Drug Administration (FDA)**, 2003. *Genesis warning letter*. De http://www.fda.gov/foi/warning_letters/g4402d.htm.
- Fox MB**, 2007. Microbial inactivation kinetics of pulsed electric field treatment. En Lelieved H.L.M., Nontermans S., de Haan S.W.H. (eds.) *Food preservation by pulsed electric field*. CRC Press, New York, pp 127.134
- Fox MB, Esveld DC, Mastwijk H, Boom RM**, 2008. Inactivation of *L. plantarum* in a PEF microreactor. The effect of pulse width and temperature on the inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 101-108.
- Fruengel F**, 1960. Method and device for electrically sterilizing and cleaning milking machines or the like. Patente EE.UU. 2, 931-947.
- Gallo LI, Pilosof AMR, Jagus RJ**, 2007. Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *Journal of Food Engineering* 79, 188-193.
- Gandhi M, Chikindas ML**, 2007. *Listeria*: a food-borne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113 (1), 1-15.
- García D, Gómez N, Condón S, Raso J, Pagán R**, 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 36, 140-144.
- García D, Gómez N, Mañas P, Condón S, Raso J, Pagán R**, 2005a. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology* 99, 94-104.
- García D, Hassani M, Mañas P, Condón S, Pagán R**, 2005b. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Safety* 25, 30-42.

- García D**, 2005c. *Mecanismos de inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje*. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- García D, Gómez N, Raso J, Pagán R**, 2005d. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 388–395.
- García D, Mañas P, Gómez N, Raso J, Pagán R**, 2006. Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 428–435.
- García D, Somolinos M, Hassani M, Álvarez I, Pagán R**, 2009. Modeling The Inactivation Kinetics Of *Escherichia Coli* O157:H7 During The Storage Under Refrigeration Of Apple Juice Treated By Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Safety* 29. 546-563.
- Gásková D, Sigler K, Janderová B, Plásek J**, 1996. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cell: factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 39, 195-202.
- Gaudreau MPJ, Hawkey T, Petry J, Kempkes MA**, 2001. A solid state pulsed power system for food processing. En *Proceedings of the 24th Pulses Power Plasma Science Conference* (p. 323). Las Vegas, EE.UU.
- Ge SH**, 2005. The application of high-voltage pulse electric field in food sterilization. *Physics and Engineering* 15, 42-44.
- Gerlach D, Alleborn N, Baars A, Delgado A, Moritz J, Knorr D**, 2008. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 408-417.
- Geveke DJ, Kozempel MF**, 2003. Pulsed electric field effects on bacteria and yeast cells. *Journal of Food Processing and Preservation* 27, 65-72.
- Gill CO, Reichel MP**, 1989. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiology* 6, 223-230.

- Gilliand SE, Speck ML**, 1967. Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. *Applied Microbiology* 15(5), 1031-1037.
- Gimsa J, Wachner D**, 2001. Analytical description of the transmembrane voltaje induced on arbitrary oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophysics Journal* 81, 1888-1896.
- Glaser RW, Leikin SL, Chernomordik LV, Pastushenko VF, Sokirko AI**, 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et Biophysica Acta* 940, 275–287.
- Gómez N, García D, Álvarez I, Condón S, Raso J**, 2005a. Modelling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields in media of different pH. *International Journal of Food Microbiology* 103, 199-206.
- Gómez N, Garcia D, Álvarez I, Raso J, Condón S**, 2005b. A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *Journal of Food Engineering* 70, 7-14.
- Gompertz B**, 1825. On the nature of the function expressive of the Law of human mortality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 115, 513-583.
- Góngora-Nieto MM**, 2001. *Pulsed Electric Fields. Biological Systems Engineering*. Tesis Doctoral. Washington State University, EE.UU.
- Góngora-Nieto MM, Younce F, Hyde GM, Pedrow PD, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV**, 2002. Metrology system for pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 337-348.
- Góngora-Nieto MM, Pedrow PD, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV**, 2003. Impact of air bubbles in a dielectric liquid when subject to high field strengths. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 57–67.
- Gossling BS**, 1960. Artificial mutation of micro-organisms by electrical shock. Patente EE.UU 2, 955 076.

- Gowrishankar TR, Esser AT, Vasilkoski Z, Smith KC, Weaver JC, 2006.** Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 1266–1276.
- Grahl T, Sitzmann W, Märkl H, 1992.** Killing of microorganisms in fluid media by high-voltage pulses. En G Kreysa, AJ Driesel (Eds.), *DECHEMA Biotechnology Conferences. Voumel 5. Part B*. ISBN: 3527285342. DECHEMA: Weinheim.
- Grahl T, Märkl H, 1996.** Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 148-157.
- Granato D, Branco GF, Calado VMA, 2011.** Experimental design and application of response surface methodology for process modeling and optimization: A review. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2010.12.008.
- Guerrero-Beltrán JA, Sepúlveda DR, Gongora-Nieto MM, Swanson B, Barbosa-Canovas GV, 2010.** Milk thermization by pulsed electric fields (PEF) and electrically induced heat. *Journal of Food Engineering* 100 (1), 56-60.
- Gurtler JB, Rivera RB, Zhang HQ, Geveke DJ, 2010.** Selection of surrogate bacteria in place of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for pulsed electric field treatment of orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 1-8.
- Gutierrez-Becerra LE, Li S, Ortega-Rivas E, Zhang QH, 2002.** Cold pasteurization of peach nectar using pulsed electric fields. *IFT Annual Meeting*, Anaheim, CA, USA.
- Haaland PD, 1989.** Statistical problem solving. En M. Deeker (Ed.), *Experimental design in biotechnology*. New York and Basel, pp. 1-18.
- Hassani M, Mañas P, Pagán R, Condón S, 2007.** Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs. *International Journal of Food Microbiology* 116 (2), 228e238.

- He H, Chang DC, Lee YK**, 2007. Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of biomolecules in HeLa cells. *Bioelectrochemistry* 70, 363–368.
- Heesch VEJM, Pemen AJM, Huijbrechts PAHJ, van der Laan PCT, Ptasinski KJ, Zandstra GJ, 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 ST, Zenker M, Knorr D**, 1999. Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. *Food Biotechnology* 13, 155-168.
- Heinz V, Knorr D**, 2000. Effect of pH, ethanol addition, and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus subtilis* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 151-159.
- Heinz V, Álvarez I, Angersbach A, Knorr D**, 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology* 12, 103-111.
- Heinz V, Álvarez I, Angersbach A, Knorr D**, 2002. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology* 12, 103-111.
- Heinz V, Toepfl S, Knorr D**, 2003. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 167-175.
- Helander IM, Mattila-Sandholm T**, 2000. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology* 60, 153-161.
- Hermawan N, Evrendilek GA, Dantzer WR, Zhang QH, Richter ER**, 2004. Pulsed electric field treatment of liquid whole egg inoculated with *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Food Safety* 24, 71-85.

- HHS (Health and Human Services), FDA (Food and Drug Administration),** 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and imprinting of juice; final rule. Federal Register, 66, FR 6137-6202.
- Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P, Fraser DW,** 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Achieves of Internal Medicine* 146, 520-524.
- Hodgins AM, Mittal GS, Griffiths MW,** 2002. Pasteurization of fresh orange juice using low-energy pulsed electrical field. *Journal of Food Science* 67, 2294-2299.
- Hofmann, GA,** 1984. Microflora reduction in liquids with pulsed electric fields. Internal Technical Report. *Biotechnologies and Experimental Research*: San Diego.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST,** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins: Baltimore.
- Huang K, Wang J,** 2009. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering* 95, 227-239.
- Huissman GW, Siegele DA, Zambrano MM, Kolter R,** 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase. en F. C. Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology* (pp. 1672-1682). American Society for Microbiology: Washington.
- Hülshager H, Niemann EG,** 1980. Lethal effects of high-voltage pulses on *E. coli* K12. *Radiation and Environmental Biophysics* 18, 281-288.
- Hülshager H, Potel J, Niemann EG,** 1981. Killing bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiation and Environmental Biophysics* 20, 53-65.
- Hülshager H, Potel J, Niemann EG,** 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 22, 149-162.

- Hurst A, Hover E**, 1993. Nisin. En: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.), *Food Antimicrobials*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., pp. 369–391.
- IFT**, 2004. Managing Food safety: Use of performance standards and other criteria in food inspection systems. *A Report of the Institute of Food Technologists*. Chicago.
- Indrawati I, Plancken I, Van Loey A, Hendrickx M**, 2008. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science and Technology* 19 (6), 300-308.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)**, 1996. *Microorganismos de los Alimentos, características de los patógenos microbianos*. Acribia: Zaragoza.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)**, 2002. *Microorganismos de los Alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Isigidi BK, Mathieu AM, Devriese LA, Godard C, van Hoof J**, 1992. Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 379-384.
- Iu J, Mittal GS, Griffiths MW**, 2001. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 64, 964-969.
- Jablonski LM, Bohach GA**, 2001. *Staphylococcus aureus* (pp 410–434). En Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2^a edn. ASM Press: Washington DC.
- Jacob HE, Förster W, 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, Meneses N, Knorr D**, 2009a. Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution, flow characteristics and temperature effects

on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 470-480.

Jaeger H, Schulz N, Karapetkov N, Knorr D, 2009b. Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 134, 154-161.

Jaeger H, Meneses N, Moritz J, Knorr D, 2010. Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing. *Journal of Food Engineering* 100, 109-118.

Jay, JM, 1992. High temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms (pp. 335-355). En Jay, JM. (ed.), *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall: New York.

Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A, 1991. Effects of high electric field pulses on *Lactobacillus brevis* at elevated temperatures. *IEEE Industry Applications Society Annual Meeting* 1, 674-681.

Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A, 1992. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnology Bioengineering* 40, 1412-1420.

Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A, 1993. The effect of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 117-122.

Jeantet R, Baron F, Nau F, Roignant M, Brulé G, 1999. High intensity pulsed electric fields applied to egg white: Effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Protection* 62, 1381-1386.

Jeyamkondan S, Jayas DS, Holley RA, 1999. Pulsed electric field processing of food: a review. *Journal of Food Protection* 62, 1088-1096.

- Jin ZT, Zhang QH**, 1999. Pulsed electric field inactivation of microorganisms and preservation of quality of cranberry juice. *Journal of Food Processing Preservation* 23, 481-497.
- Jin T, Zhang H, Hermawan N, Dantzer W**, 2009. Effects of pH and temperature on inactivation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in liquid whole egg by pulsed electric fields. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 367-372.
- Joersbo M, Brunstedt J, Floto F**, 1990. Quantitative relationship between parameters of electroporation. *Journal of Plant Physiology* 137, 169-174.
- Joshi RP, Hu Q, Schoenbach KH, Hjalmarson HP**, 2002. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses. *Physical Reviews E, Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics* 65, 041920.
- Joshi RP, Hu Q, Schoenbach KH**, 2004. Modeling studies of cell response to ultrashort, high-intensity electric fields-Implications for intracellular manipulation. *IEEE Transactions on Plasma Science* 32, 1677-1686.
- Kalchayanand N, Hanlin MB, Ray B**, 1992. Sub-lethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin ach and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 15 (6), 239-243.
- Kalchayanand N, Sikes T, Dunne CP, Ray B**, 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4174-4177.
- Katsuki S, Majima T, Nagata K, Lisitsyn I, Akiyama H, Furuta M, Hayashi T, Takahashi K, Wirkner S**, 2000. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* by pulsed electric field. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28, 155-160.
- Kehez MM, Savic P, Johnson BF**, 1996. Contribution to the biophysics of the lethal effects of electric field on microorganisms. *Biochemical and Biophysical Acta* 1278, 79-88.

- Kennedy SM, Ji Z, Hedstrom JC, Booske JH, Hagness SC**, 2008. Quantification of electroporative uptake kinetics and electric field heterogeneity effects in cells. *Biophysical Journal* 94, 5018–5027. **(la he quitado de la pag 13)**
- Kinosita K, Tsong TY**, 1977a. Voltaje-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 471, 227-242.
- Kinosita K, Tsong TY**, 1977b. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature* 268, 438-441.
- Knabel SJ, Walker HW, Hartman PA, Mendonca AF**, 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Applied Environmental Microbiology* 56 (2), 370-376.
- Knorr D, Geulen M, Grahl T, Sitzmann W**, 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology* 5, 71-75.
- Knorr D, Angersbach A**, 1998. Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science and Technology* 9, 185-191.
- Krassowska W, Filev PD**, 2007. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal* 92, 404–417.
- Krogfelt KA, Hjulgaard M, Sorensen K, Cohen PS, Givskow M**, 2000. rpoS gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* BJ4 during competitive colonization of the mouse large intestine. *Infection and Immunity* 68, 2518–2524.
- Lado BH, Yousef AE**, 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433–440.
- Lado BH, Yousef AE**, 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2223-2229.

- Lebovka NI, 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.
- Leizeron S, Shimoni E**, 2005. Stability and sensory shelf life of orange juice pasteurized by continuous ohmic heating. *Journal on Agricultural Food Chemistry* 53 (10), 4012e4018.
- Liang ZW, Mittal GS, Griffiths MW**, 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 65, 1081-1087.
- Liang ZW, Cheng Z, Mittal GW**, 2006. Inactivation of spoilage microorganisms in apple cider using a continuous flow pulsed electric field system. *LWT-Food Science and Technology* 39, 351-357.
- Lindgren M**, 2001. *Pulsed Electric Field Food Treatment and Low Frequency Bioelectromagnetics*. Tesis Doctoral. Chalmers University of Technology, Suecia.
- Lindgren M, Aronsson K, Galt S, Ohlsson T**, 2002. Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 233-245.
- Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yoekura ML, Hayes P, Weaver R, Audurier A, Plikaytis BD, Fanin SL, Kleks A, Broome CV**, 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine* 319, 823-828.
- Linton M, McClements JMJ, Patterson MF**, 2001. Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 99–104.
- Liu X, Yousef AE, Chism GW**, 1996. Inactivation of *Escherichia coli* 157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric fields. *Journal of Food Safety*, 16, 287-299.

- López N, Puértolas E, Condón S, Álvarez I, Raso J, 2008.** Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 477-482.
- López N, Puértolas E, Condón S, Raso J, Álvarez I, 2009.** Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 90, 60-66.
- Lovett J, 1989.** *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Bacterial Pathogens* (pp. 283-310). Doyle MP (ed.). Marcel Dekker: New York.
- Lubicki P, Jayaram S, 1997.** High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, 135-141.
- Lund BM, Knox MR, Cole MB, 1989.** Destruction of *Listeria monocytogenes* during microwave cooking. *Lancet*, 218.
- Lund B M, Baird-Parker TC, Gould W, 2000.** *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc: Gaithersburg.
- Mackey BM, 2000.** Injured bacteria. En M Lund, TC Baird-Parker, GW Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 315-341). Aspen Publisher: Gaithersburg.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (ed.), 1997.** *Brock: Biology of microorganisms*. Prentice Hall International: New Jersey.
- Mafart P, Couvert O, Gaillard S, Leguerinel I, 2002.** On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113.
- Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki A, Yamamoto S, Igimi S, 2005.** An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology* 104 (2), 189-196.
- Mañas P, Barsotti L, Cheftel JC, 2001.** Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters and

food constituents. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2 (4), 239-249.

Mañas P, Pagán R, 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387–1399.

Marsellés-Fontanet AR, Puig A, Olmos P, Mínguez-Sanz S, Martín-Belloso O, 2009. Optimizing the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (3), 159-165.

Martín MFS, Sepúlveda DR, Altunakar B, Góngora-Nieto MM, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV, 2007. Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT* 40 (7), 1271-1279.

Martín-Belloso O, Qin BL, Chang FJ, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, 1997a. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering* 20, 317-336.

Martín-Belloso O, Vega-Mercado H, Qin BL, Chang FG, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, 1997b. Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields. *Journal Food Processing Preservation* 21, 193-208.

Martín-Belloso O, Sobrino-López A, 2011. Combination of Pulsed Electric Fields with Other Preservation Techniques. *Food and Bioprocess Technology* DOI 10.1007/s11947-011-0512-z.

Masschalck B, Michiels CW, 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 23, 191–214.

Mastwijk HC, Bartels PV, 2001. Integrated modular design of a pulsed electrical field treatment chamber. Patente N° US 6178880, EE.UU.

Matsumoto Y, Shioji N, Stake T, Sakuma A, 1991. Inactivation of microorganisms by pulsed high voltage application. *IEEE Industry Applications Society Annual Meeting* 1, 652-659.

- Mazón A, Salvo MS, Sabalza MA**, 1998. Enteropatógenos aislados a lo largo de cinco años en Navarra. En *XI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Libro de Ponencias, comunicaciones y posters*. 96, Universidad Pública de Navarra (ed.) Pamplona.
- McCarty M**, 1996. *E. coli* O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice. *Lancet* 348, 1299.
- McClure PJ, Kelly TM, Roberts TA**, 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 14, 77-91.
- McDonal K, Sun D**, 1999. Predictive microbiology for the food industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 1–27.
- McDonald CJ, Lloyd SW, Vitale MA, Peterson K, Innings F**, 2000. Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science* 65, 984-989.
- McMeekin TA, Ross T**, 2002. Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133–153.
- McNamee C, Noci F, Cronin Da, Lyng JG, Morgan DJ, Scannell AGM**, 2010. PEF based hurdle strategy to control *Pichia fermentans*, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* k12 in orange juice. *International Journal of Food Microbiology* 138, 13-18.
- Meneses N, Jaeger H, Moritz J, Knorr D**, 2011. Impact of insulator shape, flow rate and electrical parameters on inactivation of *E. coli* using a continuous co-linear PEF system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12 (1), 6-12.
- Metrick C, Hoover D G, Farkas DF**, 1989. Effect of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54, 1547-1564.

- Min S, Zhang QH**, 2000. Effect of water activity on the inactivation of *Enterobacter cloacae* by pulsed electric field treatment. En *IFT Annual Meeting*. Dallas, EE.UU.
- Min S, Jin ZT, Min SK, Yeom H, Zhang QH**, 2003. Commercial-Scale Pulsed Electric Field Processing of Orange Juice. *Journal Of Food Science* 68 (4), 1265-1271.
- Min S, Evrendilek GA, Zhang QH**, 2007. Pulsed electric fields: processing system, microbial and enzyme inhibition, and shelf life extension of foods. *IEEE Transactions on Plasma Science* 35, 59-73.
- Mizuno A, Hori Y**, 1988. Destruction of living cells by pulsed high-voltage application. *IEEE Transactions on Industry Applications* 24, 387-394.
- Mohan N, Undeland TN, Robbins WP**, 1995. *Power electronics; converters and design*. 2ª Edición. John Wiley & Sons: Nueva York.
- Mok C, Lee S**, 2000. Sterilization of yakju (rice wine) on a serial multiple electrode pulsed electric field treatment system. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32,356–362.
- Monfort S, Gayán E, Raso J, Condón S, Álvarez I**, 2010a. Evaluation of pulsed electric fields technology for liquid whole egg pasteurization. *Food Microbiology* 27, 845-852.
- Monfort S, Gayán E, Saldaña G, Puértolas E, Condón S, Raso J, Álvarez I**, 2010b. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields in liquid whole egg. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 306-313.
- Moses BD**, 1938. Electric pasteurization of milk. *Agricultural Engineering* 19, 525-526.
- Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O**, 2007. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and

watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 117, 192-200.

Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O, 2008a. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 328-340.

Mosqueda-Melgar J, Elez-Martínez P, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O, 2008b. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 747-759.

Murray EGD, Webb RA, Swarm MBR, 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytes, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp). *Journal of Pathological Bacteriology* 29, 407-439.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) 2004. *Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization*. Washington, DC.

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

Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M, 1990. Structure and function of bacterial cells parts. En Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M (Eds.), *Physiology of the bacterial cell. A molecular approach* (pp. 506-530). Sinauer Associates: Sunderland.

Neumann E, Rosenheck K, 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology* 10, 279-290.

Ng TM, Schaffner DW, 1997. Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4) 1237-1243.

- Nguyen P, Mittal GS**, 2007. Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 360–365.
- Noci F, Riener J, Walkling-Ribeiro M, Cronin DA, Morgan DJ, Lyng JG**, 2008. Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of Food Engineering* 85, 141-146.
- O'Brien AD, Holmes RK**, 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiological reviews* 51, 206-220.
- Ohshima T, Akuyama K, Sato M**, 2002. Effect of culture temperature on high-voltage pulsed electric sterilization of *Escherichia coli*. *Journal of Electrostatics* 55, 227-235.
- Ortega-Rivas E**, 2011. Critical Issues Pertaining to Application of Pulsed Electric Fields in Microbial Control and Quality of Processed Fruit Juices. *Food Bioprocess Technology* 4 (4), 631-645.
- Pagán R, Esplugas S, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1998. Inactivación of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Science and Technology International* 4, 33-44.
- Pagán R, Mañas P**, 2006. Fundamental Aspects of Microbial Membrane Electroporation. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 73-94). Springer: Nueva York.
- Parish Me, Higgins DP**, 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection* 52 (3), 144-147.
- 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**, 1995. A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 93-99.

- Peleg M, Cole MB**, 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 3, 353-380.
- Peleg M, Pechina CM**, 2000. Modelling microbial survival during exposure to lethal agent varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 159-172.
- Pennington H**, 2010. *Escherichia coli* O157. *The Lancet* 376, 1428-1435.
- Pérez MCP, Aliaga DR, Bernat CF, Enguidanos MR, López AM**, 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal*, 17, 1441-1449.
- Periago PM, Palop A, Martínez A, Fernández PS**, 2002. Exploring new mathematical approaches to microbial food safety evaluation: an approach to more efficient risk assessment implementation. *Dairy, Food, and Environmental Sanitation* 22, 18-23.
- Picart L, Dumay E, Cheftel JC**, 2002. Inactivation of *Listeria innocua* in dairy fluids by pulsed electric fields: influence of electric parameters and food composition. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3 (4), 357-369.
- Pilavtepe-Çelik M, Buzrul S, Alpas H, Bozoğlu F**, 2009. Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. *Journal of Food Engineering* 90 (3), 388-394.
- Pina-Perez MC, Silva-Angulo AB, Rodrigo D, Martínez-López A**, 2009. Synergistic effect of Pulsed Electric Fields and CocoonOX 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, 196-204.
- Pirie JHH**, 1940. *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. *Nature* 154, 264.

- Pizzichemi M, Occhialini PDG**, 2007. Application of pulsed electric fields to food treatment. *Nuclear B-Proceeding Supplements* 172, 314-316.
- Plym Forshell L, Wierup M**, 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. Scientific and Technical Review. *OIE World Organisation for Animal Health*, 25, 541–554.
- Pol IE, Mastwijk HC, Bartels PV, Smid E J**, 2000. Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 428-430.
- Pol IE, Mastwijk HC, Slump RA, Popa ME, Smid E J**, 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection* 64, 1012-1018.
- Polotsky YVE, Dragunskaya EM, Seliverstova V, Ardeeva TA, Chakhutinskaya MG, Ketyi I, Vertenyi A, Ralovich B, Emody L, Malovics I, Safonova NV, Snigerevskanaya ES, Karyagina EI**, 1977. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhea. *Acta Microbiologica Hungarica* 24; 221-236.
- Pothakamury UR, Monsalve-González A, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1995. High voltaje pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* 35 (1), 101-107.
- Pothakamury UR, Vega H, Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1996. Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 59, 1167-1171.
- Powell KT, Weaver JC**, 1986. Transients aqueous pores in bilayer membranes: A statistical theory. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 15, 211
- Prochownick L, Spaeth F**, 1890. Über die keimtötende Wirkung des galvanischen Stroms. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 26, 564-565.

- Pruitt K, Kamau DN**, 1993. Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 221-231
- Pucihar G, Kotnik T, Valic B, Miklavcic D**, 2006. Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Analytical Biomedical Engineering* 34, 642-652.
- Puértolas E, Saldaña G, Condón S, Raso J, Álvarez I**, 2008. Evaluación de un equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la inactivación microbiana y la extracción de compuestos intracelulares. En Raventós M y Salazar J (Eds.), CESIA-CIBSA 2008. ISBN: 9788496736573. CIME: Barcelona.
- Puértolas E, López N, Condón S, Álvarez I, Raso J**, 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 130, 49-55.
- Puértolas E**, 2010a. *Aplicación de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje al proceso de vinificación*. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- Puértolas E, López N, Saldaña G, Álvarez I, Raso J**, 2010b. Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering* 98, 120-125.
- Puértolas E, López N, Condón S, Álvarez I, Raso J**, 2010c. Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science and Technology* 21, 247-255.
- Puértolas E, Saldaña G, Álvarez I, Raso J**, 2011. Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. *Food Chemistry* 126, 1482-1487.
- Püttmann M, Ade N, Hof H**, 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria* spp. on growth temperature. *Research in Microbiology* 144 (4), 279-283.

- Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Pedrow PD, Olsen RG, 1991.** A continuous treatments system for inactivating microorganisms with pulsed electric fields. En *IEEE Industry Application Society Meeting*, IEEE, Piscataway NJ. Pp- 1345-1352.
- Qin BL, Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Pedrow PD, 1994.** Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 1, 1047-1057.
- Qin BL, Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Pedrow PD, 1995a.** Pulsed electric field treatment chamber design for liquid food pasteurization using finite element method. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 38, 557-565.
- Qin BL, Chang FJ, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, 1995b.** Nonthermal inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields. *LWT*, 28,564–568.
- Qin BL, Pothakamury UR, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Peleg M, 1996.** Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, 603-627.
- Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Pedrow PD, Olsen RG, Zhang QH, 1997.** *Continuous flow electrical treatment of flowable food products.* Patente N° US 5662031, EE.UU.
- Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Pedrow PD, Olsen RG, 1998.** Inactivation microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment chamber. *IEEE Transactions on Industry Applications* 34, 43-50.
- Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, Pedrow PD, Olsen RG, Zhang QH, 2000.** *Continuous flow electrical treatment of flowable food products.* Patente N° US 6019031, EE.UU.
- Qiu X, Sharma S, Tuhela L, Zhang QH, 1998.** An integrated PEF pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 41, 1069-1074.

- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL, 2005.** Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging Infectious Diseases* 11 (4), 603-609.
- Rajkovic A, Smigic N, Devlieghere F, 2010.** Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S29-S42.
- Ramaswamy HS, Abbatemarco C, 1996.** Thermal processing of fruits. Em LP Somogyi, HS Ramaswamy, YH Hui (Eds.), *Processing fruits: Science and Technology (I)* (pp. 25-65). Technomic Publishing Co: Lancaster Basel.
- Raso J, Pagán R, Condón S, Sala FJ, 1998a.** Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), 465-471.
- Raso J, Palop A, Pagán R, Condón S, 1998b.** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of Applied Microbiology* 85, 849-854.
- Raso J, Álvarez I, Condón S, Sala-Trepat FJ, 2000.** Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 21-29.
- Raso J, Barbosa-Cánovas GV, 2003.** Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews on Food Science* 43, 265-285.
- Raso J, Heinz V, 2006.** *Pulsed electric fields for the food industry: fundamentals and applications*. New York: Springer.
- Ravishankar S, Fleischman GJ, Balasubramaniam VM, 2002.** The inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology* 19, 351-361.
- Reina LD, Jin ZT, Zhang QH, Yousef AE, 1998.** Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 61, 1203-1206.

- Reitler W**, 1990. *Conductive heating of foods*. Tesis Doctoral. TU Munich, Alemania.
- Riley LW, Remis RS, Heigerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Herbert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Harrett NT, Blake PA, Cohen ML**, 1982. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine* 308, 681-685.
- Riemann F, Zimmermann U, Pilwat G**, 1975. Release and uptake of haemoglobin and ions in red blood cells induced by dielectric breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta* 394, 449-462.
- Rivas A, Sampedro F, Rodrigo D, Martínez A, Rodrigo M**, 2006. Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 541–545.
- Robey M, Benito A, Hutson RH, Pascual C, Park SF, Mackey BM**, 2001. Variation in resistance to high hydrostatic pressure and rposS heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4901–4907.
- Rodrigo D, Martínez A, Harte F, Barbosa-Cánovas GV, Rodrigo M**, 2001. Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange-carrot juice by means of pulsed electric fields: comparison of inactivation kinetics models. *Journal of Food Protection* 64 (2), 259-263.
- Rodrigo D, Ruiz P, Barbosa-Cánovas GV, Martínez A, Rodrigo M**, 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 81, 223-229.
- Rodríguez E, Seguer J, Rocabayera X, Manresa A**, 2004. Cellular effects of monohydrochloride of l-arginine, N^α-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 96, 903–912.
- Rodríguez-Calleja JM, Cebrián G, Condón S, Mañas P**, 2006. Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric

field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1054–1062.

Roodenburg B, de Haan SWH, van Boxtel LBJ, Hatt V, Wouters PC, Coronel P, Ferreira JA, 2010. Conductive plastic film electrodes for Pulsed Electric Field (PEF) treatment - a proof of principle -. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 274-282.

Russell NJ, Colley M, Simpson RK, Trivett AJ, Evans RI, 2000. Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacterial is an ‘all-or-nothing’ effect. *International Journal of Food Microbiology* 55, 133–136.

Russell NJ, 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology* 79, 27-34.

Saldaña G, Puértolas E, López N, García D, Álvarez 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, 160-165.

Saldaña G, Puértolas E, Álvarez I, Meneses N, Knorr D, Raso J, 2010a. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering*, 100, 349-356.

Saldaña G, Puértolas E, Condón S, Álvarez I, Raso J, 2010b. Modelling 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, 290-298.

Saldaña G, Puértolas E, Condón S, Álvarez I, Raso J, 2010c. Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and

Staphylococcus aureus in media of different pH. *Food Microbiology*, 27, 550-558.

Saldaña G, Minor-Pérez H, Raso J, Álvarez I, 2011a. Combined effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Foodborne pathogens and diseases*. DOI: 10.1089/fpd.2010.0788.

Saldaña G, Monfort S, Condón S, Raso J, Álvarez I, 2011b. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.059.

Saldaña G, Álvarez I, Condón S, Raso J, 2011c. Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization. *Trends in Food Science and Technology*. Enviado.

Saldaña G, Puértolas E, Monfort S, Raso J, Álvarez I, 2011d. Defining Treatment Conditions for PEF Pasteurization of Apple Juice. *International Journal of Food Microbiology*. Enviado.

Sale AJH, Hamilton WA, 1967a. Effect of high electric field on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 148, 781-788.

Sale AJH, Hamilton WA, 1967b. Effect of high electric field on microorganisms. II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta* 148, 789-800.

Sale AJH, Hamilton WA, 1968. Effect of high electric field on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 163, 37-43.

Salmon DE, Smith T, 1885. Report on swine plague, 2nd Annual Report. Washington DC: *Department of Agriculture, Bureau of Annual Industries*, 184-246.

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.

Sampedro F, Rivas A, Rodrigo D, Martínez A, Rodrigo M, 2007. 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, 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 MF, Sepúlveda DR, Altunakar B, Góngora-Nieto MM, Swanson BG, Barbosa-Cáovas GV, 2007. Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT* 40, 1271-1279.

Sato M, Ishida NM, Sugiarto AT, Ohshima T, Taniguchi H, 2001. High-efficiency sterilizer by high-voltage pulse using concentrated-field electrode system. *IEEE Transactions on Industry Applications* 37, 1646-1650.

Saulis G, Venlauskas MS, Naktinis J, 1991. Kinetics of pore resealing in cell membrane after electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 26, 1-13.

Saulis G, Venlauskas MS, 1993a. Cell electroporation. Part 1. Theoretical simulation of the process of pore formation in the cell. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32, 221-235.

Saulis G, Venlauskas MS, 1993b. Cell electroporation. Part 2. Experimental measurements of the kinetics of pore formation in human erythrocytes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32, 237-248.

Saulis G, Wouters PC, 2007. Probable mechanisms of microorganism inactivation by pulsed electric fields. En H. L. M. Lelieveld, S. Notermans, S. W. H. de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields. From research to application* (pp. 138–155). CRC Press: Boca Raton.

- Saulis G**, 2010. Electroporation of Cell Membranes: The Fundamental Effects of Pulsed Electric Fields in Food Processing. *Food Engineering Review* 2, 52-73.
- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB**, 2008. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated haemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology* 23, 1749–1760.
- Schenk M, Guerrero S, Alzamora SM**, 2008. Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food Bioprocessing and Technology*. 1 (4), 384-392.
- Schilling S, Alber T, Toepfl S, Neidhart S, Knorr D, Schieber A, Carle R**, 2007. Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 127-134.
- Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Jhonson SE, King SH, Nichols ES, Broome CV**, 1983. Epidemic listeriosis – Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308, 203-208.
- Schoenbach KH, Fellow, IEEE, Peterkin FE, Alden RW, III, Beebe SJ**, 1997. The Effect of Pulsed Electric Fields on Biological Cells: Experiments and Applications. *IEEE Transactions on Plasma Science* 25 (2), 284-292.
- Sensory I, Zhang QH, Sastry SK**, 1997. Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field. *Journal of Food Process Engineering* 20, 367-381.
- Sepúlveda DR, Góngora-Nieto MM, Guerrero JA, Barbosa-Cánovas GV**, 2004. Production of extended-shelf life milk by processing pasteurized milk with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 67, 81-87.
- Sepúlveda DR, Góngora-Nieto MM, San-Martín MF, Barbosa-Cánovas GV**, 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology* 38, 167-172.

- Sepúlveda DR, Guerrero JA, Barbosa-Cánovas GV**, 2006. Influence of electric current density on the bactericidal effectiveness of pulsed electric field treatments. *Journal of Food Engineering*, 76, 656-663.
- Sepulveda DR, Gongora-Nieto MM, Guerrero JA, Barbosa-Canovas GV**, 2009. Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *Lwt-Food Science and Technology* 42, 735-739.
- Shamsi K, Versteeg C, Sherkat F, Wan J**. 2008. Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 217-233.
- Sherry AE, Patterson MF, Madden RH**, 2004. Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 887–893.
- Shinagawa K, Hu DY, Yoshida S**, 1997. Correspondence and problem for hemorrhagic *E. coli* O157 outbreak in Morioka City, Iwate. *Koshu Eisei In Kenkyu Hokoku* 46, 104–112.
- Silva FVM, Gibbs PA**, 2010. Non-proteolytic *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold-distributed foods and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science and Technology* 21, 98-105.
- Simpson RK, Whittington R, Earnshaw RG, Russell NJ**, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 1–10.
- Sitzmann W, Münch EW**, 1988. Das ELCRACK Verfahren: Ein neues Verfahren zur Verarbeitung tierischer Rohstoffe. *Die Fleischmehlindustrie* 40, 22-28.
- Sitzmann W, Münch EW**, 1989. Elektrische Verfahren zur Keimabtötung. *Die Ernährungsindustrie* 6, 54-58.
- Skandamis PN, Yoon Y, Stopforth JD, Kendall PA, Sofos JN**, 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*. 25 (2), 294-303.

- Smelt JPPM, Rijke AGF, Wouters PC**, 1997. Inactivation of microorganisms by high pressure. En D. Reid, *The properties of water in foods ISOPOW 6 conference* (pp. 398-417). London: Blackie Academic and Professional.
- Smith K, Mittal GS, Griffiths MW**, 2002. Pasteurization of milk using pulsed electric field and antimicrobials. *Journal of Food Science* 67, 2304-2308.
- Sobrino-López A, Martín-Belloso O**, 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection* 69, 345-353.
- Sobrino-López A, Martín-Belloso O**, 2008. Enhancing the Lethal Effect of High-Intensity Pulsed Electric Field in Milk by Antimicrobial Compounds as Combined Hurdles. *American Dairy Science Association* 91, 1759-1768.
- Soliva-Fortuny R, Balasa A, Knorr D, Martín-Belloso O**, 2009. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20 (11-12), 544-556.
- Somolinos M, García D, Condón S, Mañas P, Pagán R**, 2007. Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3814-3821.
- Somolinos M, García D, Mañas P, Condón S, Pagán R**, 2008a. Effect of environmental factors and cell physiological state on Pulsed Electric Fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 124, 260-267.
- Somolinos M, Mañas P, Condón S, Pagán R, García D**, 2008b. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* sublethally injured cells after Pulsed Electric Fields. *International Journal of Food Microbiology* 125, 352-356.
- Stanley DW**, 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science* 30, 487-553.

- Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR**, 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. *Journal of Food Protection* 55 (10), 763–766.
- Stewart CM, Tompkin RB, Cole MB**, 2002. Food Safety: new concepts for the new millennium. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 105-112.
- Stringer SC, George SM, Peck MW**, 2000. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Applied Microbiology Symposium*, 88, 79S–89S.
- Stumbo CR**, 1973. *Thermobacteriology in food processing*. 2^a ed. Academic Press: New York.
- Surkiewicz BF, Johnston RW, Elliott RP, Simmons ER**, 1972. Bacteriological survey of fresh pork sausage produced at establishments under federal inspection. *Applied Microbiology* 23, 515-520.
- Surkiewicz BF, Harris ME, Elliott RP, Macaluso JF, Strand MM**, 1975. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. *Applied Microbiology* 29, 331-334.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL**, 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365, 1073–1086.
- Tatebe W, Muraji M, Fujii T, Berg H**, 1995. Re-examination of electropermeabilization on yeast cells: dependence on growth phase and ion concentration. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 38, 149-152.
- Tauscher B**, 1998. High pressure and chemical reactions: Effects on nutrients and pigments. En: Autio K (ed.), *Fresh novel foods by high pressure*, Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland (1998), pp. 83–95.
- Tauxe RT**, 1991. *Salmonella*: a postmodern pathogen. *Journal of food protection*, 54 (7), 563-568.
- Teissie J, Tsong TY**, 1981. Electric field induced transient pores in phospholipids bilayer vesicles. *Biochemistry* 20, 1548-1554.

- Teissié J, Eynard N, Vernhes MC, Bénichou A, Ganeva V, Balutzov B, Cabanes PA, 2002.** Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review. *Bioelectrochemistry* 55 (1-2), 107-112.
- Terebiznik MR, Jagus RJ, Cerrutti P, de Huergo MS, Pilosof AMR, 2000.** Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 63, 741-746.
- Terebiznik M, Jagus R, Cerrutti P, de Huergo MS, Pilosof AMR, 2002.** Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *Journal of Food Protection* 65, 1253-1258.
- Toepfl S, Heinz V, Knorr D, 2005.** Overview of Pulsed Electric Field Processing for Food. En DW Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 69-97). Academic Press: Londres.
- Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D, 2006.** Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing, *Food Reviews International*, 22, 405-423.
- Toepfl S, Heinz V, Knorr D, 2006.** Applications of Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 197-221). Springer: Nueva York.
- Toepfl S, Heinz V, Knorr D, 2007a.** History of pulsed electric field treatment. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 9-39). Woodhead Publishing: Cambridge.
- Toepfl S, Heinz V, Knorr D, 2007b.** High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing* 46, 537-546.
- Toepfl S, 2009.** Examples of novel technologies, high pressure and pulsed electric fields. *IAFP Symposium Food Safety*, October, 9th, Berlin, Germany.

- Tonello C**, 2011. Case studies on High-Pressure Processing of Foods. En Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G.V., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D.F., & Yuan, J.T.C. (Eds.), *Nonthermal processing Technologies for Food* (pp. 36-50). Willey-Blackwell: Oxford.
- Tsong TY**, 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal* 60, 297-306.
- Tsuchiya H, Sato M, Kanematsu N, Kato M, Hoshino Y**, 1987. Temperature-dependent changes in phospholipid and fatty acid composition and membrane lipid fluidity in *Yersinia enterocolitica*. *Letters in Applied Microbiology* 5, 15-18.
- Uesugi AR, Woodling SE, Moraru CI**, 2007. Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of Food Protection* 70, 2518-2525.
- Ukuku D, Yuk HG, Zhang H**, 2010. Behavior of Pulsed Electric Fields Injured *Escherichia coli* O157:H7 Cells in Apple Juice Amended with Pyruvate and Catalase. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. DOI:10.4172/1948-5948.1000038
- Ulmer HM, Heinz V, Ganzle MG, Knorr D, Vogel RF**, 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology* 93, 326-335.
- Valic B, Golzio M, Pavlin M, Schatz A, Faurie C, Gabriel B, Tessie J, Rols MP, Miklavcic D**, 2003. Effect of induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *European Biophysics Journal* 32, 519-528.
- van Boeckel MAJS**, 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74, 139-159.
- Van den Bosch HFM**, 2007. Chamber design and process conditions for pulsed electric field treatment of food. En HLM Lelieveld, S Notermans, SWH de Haan (Eds.), *Food preservation by pulsed electric fields* (pp. 70-93). Woodhead Publishing: Cambridge.

- van Schorthost M**, 1998. Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures. *Food Control* 9, 379-384.
- Vega-Mercado H, Pothakamury UR, Chang FJ, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1996. Inactivation of *Escherichia coli* combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Research International* 29, 117-121.
- Virto R, Sanz D, Álvarez I, Condón S, Raso J**, 2006. Application of the Weibull model to describe inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by citric and lactic acid at different temperatures. *Journal on Science Food Agriculture* 86 (6), 865-870.
- Vojdani JD, Beuchat LR, Tauxe RV**, 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2), 356–634.
- Vorobiev E, Lebovka NI**, 2006. Extraction of Intracellular Components by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 153-193). Springer: Nueva York.
- Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Lyng JG, Morgan DJ**, 2008a. Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *Journal of Food Science* 73, M395-M399.
- Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Riener J, Lyng JG, Morgan DJ**, 2008b. Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 89 (3), pp. 267-273.
- Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Lyng JG, Morgan DJ**, 2009a. Antimicrobial effect and shelf-life extension by combined thermal and pulsed electric field treatment of milk, *Journal of Applied Microbiology*, 106, 241–248.
- Walkling-Ribeiro M, Noci F, Riener J, Cronin DA, Lyng JG, Morgan DJ** 2009b. The Impact of Thermosonication and Pulsed Electric Fields on *Staphylococcus*

- aureus* Inactivation and Selected Quality Parameters in Orange Juice. *Food Bioprocess Technology*, 2, 422–430.
- Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Lyng JG, Morgan DJ**, 2010. Shelf Life And Sensory Attributes Of A Fruit Smoothie-Type Beverage Processed With Moderate Heat And Pulsed Electric Fields. *LWT* 43 (7), 1067-1073.
- Wan J, Coventry J, Swiergon P, Sanguansri P, Versteeg C**, 2009. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 414-424.
- Weaver JC, Barnett A**, 1992. Progress toward a theoretical model for electroporation mechanism: membrane electrical behaviour and molecular transport. En Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE (Eds.) *Guide to electroporation and electrofusion* (pp 91–117). Academic Press, Inc: New York.
- Weaver JC, Chizmadzhev YA**, 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41, 135–160.
- Weibull W**, 1951. A Statistical Distribution Function of Wide Applicability. *Journal of Applied Mechanics-Transactions of the ASME* 18, 293-297.
- Wesierska E, Trziazka T**, 2007. Evaluation of the use of pulsed electrical field as a factor with antimicrobial activity. *Journal of Food Engineering* 78, 1320–1325.
- Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, Hudson MJ, Roderick PJ**, 1999. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *British Medical Journal*, 318, 1046–1050.
- Whiting RC**, 1995. Microbial Modelling in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35 (6), 467-494.
- Whitney BM, Williams RC, Eifert J, Marcy J**, 2007. High-pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157:H7 strains and *Salmonella*

serovars in tryptic soybroth, distilled water, and fruit juice. *Journal of Food Protection*, 70, 2078–2083.

Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR, 2000. *Escherichica coli* (pp. 1136-1177). En Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, (eds.), *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publishers: Gaithersbourg.

Wilson G, Miles A, Parker MT, 1983. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity* (7th ed.). Williams and Wilkins: Baltimore.

Wouters PC, Smelt JPPM, 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation. *Food Biotechnology* 11, 193–229.

Wouters PC, Dutreux N, Smelt JPPM, Lelieveld HLM, 1999. Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5364-5371.

Wouters PC, Álvarez I, Raso J, 2001a. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* 12, 112-121.

Wouters PC, Bos AP, Ueckert J, 2001b. Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3092-3101.

WTO (World Trade Organization), 1995. Acuerdo sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias. En http://www.wto.org/spanish/tratop_s/sps_s/spsagr_s.htm

Wu Y, Mittal GS, Griffiths MW, 2005. Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials. *Biosystems Engineering* 90, 1-7.

Xiong R, Xie G, Edmondson AE, Sheard MA, 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 46, 45-55.

- Yin, YG, Zhang QH, Sastry SK**, 1997. High Voltage Pulsed Electric Field Treatment Chamber for the Preservation of Liquid Food Products. Patente N° US 5690978, EE.UU.
- Zeidler G**, 1997. *Functionality of proteins in food*. Springer: Berlin.
- Zhang Q, Monsalve-González A, Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1994a. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by square-wave and exponential-decay pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering* 17, 469-478.
- Zhang Q, Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1994b. Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation* 19, 103-118.
- Zhang Q, Monsalve-González A, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1994c. 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 GV, Swanson BG**, 1995. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering* 25, 261-281.
- Zhang Q, Qin BL, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG**, 1996. Batch-mode food treatment using pulsed electric fields. Patente N° US 5549041, EE.UU.
- Zhang Y, Mittal GS**, 2005. Inactivation of spoilage microorganisms in mango juice using low energy pulsed electric field in combination with antimicrobials. *Ital. Journal of Food Science* 17 (2), 167-176.
- Zhao T, Doyle MP, Besser RE**, 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2526–2530.
- Zhao W, Yang R, Lu R, Wang M, Qian P, Yang W**, 2008. Effect of PEF on microbial inactivation and physical–chemical properties of green tea extracts, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 425–431.

- Zhao W, Yang RJ, Wang M**, 2009. Cold storage temperature following pulsed electric fields treatment to inactivate sublethally injured microorganisms and extend the shelf life of green tea infusions. *International Journal of Food Microbiology* 129, 204-208.
- Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F**, 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysics Journal* 14, 881-899.
- Ziwei L, Cheng Z, Mittal GS**, 2005. Inactivation of spoilage microorganisms in apple cider using a continuous flow pulsed electric field system. *LWT-Food Science and Technology* 39, 350-356.
- Zwietering MH**, 2002. Quantification of microbial quality and safety in minimally processed foods. *International Dairy Journal* 12, 263-271.



FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

