

*Inactivación de Listeria
monocytogenes por
Pulsos Eléctricos de Alto
Voltaje en zumos.*

Memoria Trabajo Fin de Grado en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos

Natalia Escursell Arcega

2012-2013

Datos personales: Avd/ Salvador Allende nº 16 1ºB; 73012993-E;
675320841; nataxa37@hotmail.com

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Mecanismo de acción de los PEAV	3
1.2. Factores que afectan a la inactivación microbiana por PEAV	4
1.2.1 Parámetros de procesado	4
1.2.2 Características del microorganismo	10
1.2.3. Características del medio de tratamiento	10
1.3 Inactivación microbiana en alimentos líquidos	12
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Medios y reactivos	14
3.2. Microorganismos	14
3.2.1. Obtención de la suspensión	14
3.2.2. Curvas de crecimiento	15
3.3 Determinaciones de resistencia al calor	16
3.4. Tratamiento de PEAV	17
3.4.1. Generador de pulsos eléctricos	17
3.4.2. Cámaras de tratamiento	19
3.4.3 Configuración del equipo para el tratamiento en flujo continuo	21
3.5. Metodología para la aplicación de los tratamientos de PEAV	21
3.5.1 Metodología seguida para el tratamiento de PEAV en flujo estático	21
3.5.2 Metodología seguida para el tratamiento de PEAV en flujo continuo	22
3.6. Incubación y recuento de supervivientes	23
3.6.1. Recuento de supervivientes	23
3.7 Análisis estadísticos de los resultados	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Inactivación por calor.	25
4.2. Inactivación por PEAV y temperatura en condiciones estáticas	26
4.3 Inactivación por PEAV y temperatura en condiciones de flujo continuo	28
5- CONCLUSIONES	36
CONCLUSIONS	37
6. APORTACIONES	37
7. EVALUACIÓN Y SUGERENCIAS DE MEJORA	39
8. BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros con propiedades nutritivas y organolépticas similares al producto fresco está haciendo que se investiguen nuevos métodos de inactivación microbiana no térmicos que puedan sustituir a los tratamientos por calor. Una de estas tecnologías son los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) ya que permite destruir las células vegetativas de microorganismos patógenos sin apenas afectar a las características organolépticas del producto aspecto fundamental en alimentos sensibles al calor como son los zumos y en especial el de naranja.

Si bien existen muchos datos sobre la eficacia letal de los PEAV sobre microorganismos, son escasos los trabajos realizados en zumo de naranja con el objetivo de destruir patógenos como *Listeria monocytogenes*, bacteria patógena para el humano y de extendida ubicuidad, responsable de infecciones alimentarias por consumo de zumos entre otros alimentos. Es decir, no hay datos concluyentes que permitan conocer la eficacia letal de los PEAV sobre este microorganismo en el zumo de naranja.

Así pues, el objetivo principal de este trabajo ha sido investigar la eficacia letal de los tratamientos PEAV sobre *L. monocytogenes* tratada en zumo de naranja y establecer las condiciones de procesamiento necesarias para garantizar la inocuidad del producto en relación a este microorganismo.

Los resultados obtenidos han permitido observar que la aplicación de PEAV a temperatura ambiente apenas inactiva a este microorganismo. Sin embargo, la aplicación de estos tratamientos a temperaturas de 30, 35 y 40°C ha permitido incrementar la eficacia letal de los PEAV. En base a esta combinación de PEAV y temperaturas subletales, se han podido definir, mediante el desarrollo de modelos matemáticos predictivos, condiciones de procesamiento mediante la tecnología PEAV que permiten garantizar la destrucción de más de 4 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en el zumo de naranja con tiempos de tratamiento PEAV de aproximadamente 1 segundo y temperaturas inferiores a 60°C.

SUMMARY

The growing demand by consumers for safe food with nutritional and organoleptic properties similar to the fresh product is making investigation into new non-thermal methods of microbial inactivation that could replace treatments by heat. One of these

technologies are electric pulses of high voltage (PEAV) enabling you to destroy the vegetative cells of pathogenic microorganisms without hardly affect the organoleptic characteristics of the product fundamental aspect in heat-sensitive foods such as juices and especially the Orange. While there are many details about the deadly effectiveness of the PEAV on microorganisms, are scarce work in orange juice in order to destroy pathogens such as *Listeria monocytogenes*, pathogenic bacteria for human and extended ubiquity, responsible food consumption of juices among other food infections. I.e., there is no conclusive data that allow to know the deadly effectiveness of the PEAV on this microorganism in the orange juice. Thus, the main objective of this work has been investigating lethal effectiveness of treatments PEAV on *Listeria monocytogenes* treated in orange juice and establish processing conditions to ensure the safety of the product in relation to this organism. The results have allowed to observe PEAV applying to temperature environment hardly inactive this microorganism. However, the application of these treatments at temperatures of 30, 35 and 40 °c has allowed to increase the lethal effectiveness of the PEAV. Based on this combination of PEAV and sublethal temperatures, you have failed to define, through the development of predictive mathematical models, processing technology PEAV conditions that guarantee the destruction of more than 4 logarithmic cycles of *Listeria monocytogenes* in orange juice with treatment times PEAV of approximately 1 second and temperatures below 60 ° C.

1. INTRODUCCIÓN

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 (μ s) 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. El aumento de la demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros con propiedades nutritivas y organolépticas similares a las del 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. Por ello, los PEAV son considerados, en la actualidad, como una de las tecnologías emergentes para pasteurización de alimentos especialmente sensibles al calor como los zumos de frutas y especialmente el de naranja por su notable sensibilidad al calor (Toepfl., 2012).

La utilización de los PEAV como sistema de pasteurización de zumos requiere entre otros aspectos, conocer los principales factores que condicionan la muerte microbiana por esta tecnología así como el mecanismo implicado en la misma.

1.1 Mecanismo de acción de los PEAV

El mecanismo por el cual actúan los PEAV inactivando a los microorganismos es el de la **electroporación**, es decir, la formación de poros en las envolturas celulares que producen la salida del material intracelular produciendo la muerte del microorganismo.

Una de las teorías para explicar el mecanismo por el cual se produce la electroporación de las membranas por la aplicación de un campo eléctrico es la *teoría electromecánica*, la cual asume que, las fuerzas de atracción que se establecen entre los iones cargados localizados a ambos lados de la membrana como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico provocan la compresión de la membrana. Cuando las fuerzas de atracción son superiores a las fuerzas viscoelásticas de la propia membrana se produce la formación de poros y como consecuencia el incremento de la permeabilidad de la membrana (Zimmermann et al., 1974).

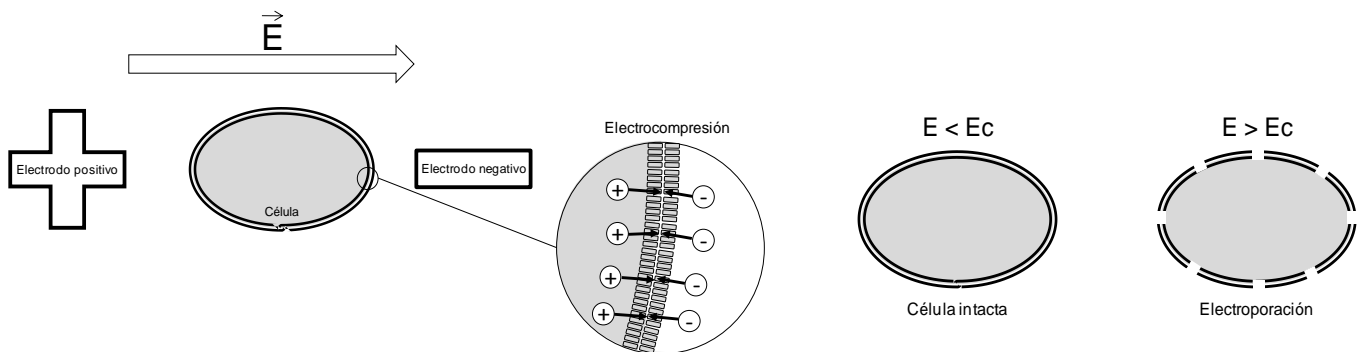


Figura 1.1. Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según los “modelos electromecánicos”. E es el campo eléctrico aplicado y E_c es el campo eléctrico crítico. (extraído de Saldaña 2011 – Tesis Doctoral).

1.2. Factores que afectan a la inactivación microbiana por PEAV

Igual que ocurre con otras tecnologías que actúan inactivando microorganismos, la resistencia microbiana a los PEAV depende de muchos factores. Con objeto de establecer las condiciones de procesado que permitan obtener alimentos estables y seguros es necesario conocer cómo influyen estos factores en la inactivación microbiana. Dichos factores se pueden clasificar en tres grupos: parámetros de procesado, características de los microorganismos y características del medio de tratamiento.

1.2.1 Parámetros de procesado

Son varios los parámetros de procesado que determinan la eficacia letal de los tratamientos de PEAV, siendo la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la energía específica los principales parámetros de control durante el proceso (Raso, J; Heinz, V; 2006). 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).

- **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 y se suele expresar en kV/cm:

(Ec. 1.1)
$$E = v / d$$

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 de al menos 20 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, que es la utilizada en esta investigación y que se describe en la sección de metodología, se realiza a partir de la ecuación 1.1. La utilización de este tipo de cámaras permite aplicar una distribución uniforme del campo

eléctrico dentro de la cámara de tratamiento, la mejor de todas las configuraciones de cámara existentes.

- **Forma del pulso**

Los dos tipos de pulsos eléctricos más habituales utilizados en el procesamiento de los alimentos por PEAV son los pulsos de caída exponencial y los pulsos de onda cuadrada. 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 (Góngora-Nieto *et al.*, 2002). Desde un punto de vista práctico, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los pulsos de caída exponencial ya que permiten un perfecto control del tiempo y voltaje aplicado, y por esta razón son los utilizados en este trabajo.

- **Tiempo de tratamiento**

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

$$(Ec. 1.2) \quad t = \tau * n$$

Generalmente, tanto el tiempo de tratamiento como la anchura del pulso se expresan en microsegundos (μs).

- **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.

- **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 (R) de la cámara, medida en Ohmios (Ω) 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):

$$(Ec. 1.3) \quad R = \rho * d / A$$

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). La conductividad del alimento tratado es un parámetro a tener en cuenta dado que aumenta con la temperatura y condiciona la intensidad del voltaje a aplicar y, por tanto, el coste energético del proceso como se discute posteriormente.

- **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 la siguiente expresión:

$$(Ec. 1.4) \quad W = V \cdot I \cdot t$$

donde V es la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de la cámara de tratamiento; I es la intensidad de corriente (A) y t es la duración del pulso (s). Con objeto de conocer el coste energético del proceso, se utiliza el parámetro energía específica (W') que se calcula dividiendo la energía aplicada por la masa (m) de producto procesado, multiplicado por el número (n) total de pulsos.

$$W' = W * n / m$$

- **Temperatura**

Aunque los tratamientos de inactivación microbiana por PEAV se aplican a temperaturas por debajo de las consideradas letales para los microorganismos, sus efectos letales aumentan de forma sinérgica al hacerlo la temperatura del medio de tratamiento (Álvarez *et al.*, 2006). Este incremento ha sido observado tanto a temperaturas no letales (Heinz *et al.*, 2003; Fleischman *et al.*, 2004; Saldaña, 2010) como letales (Sepúlveda *et al.*, 2004). Esta mayor sensibilidad de los microorganismos a los PEAV al aumentar la temperatura del medio de tratamiento se ha atribuido a la

modificación de la fluidez de los fosfolípidos que favorece la electroporación de la membrana.

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). Generalmente, los estudios realizados sobre la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEAV se han realizado utilizando cámaras de tratamiento en flujo continuo. En estos estudios, se modificaba la temperatura de entrada del producto en la cámara de tratamiento y la temperatura de salida dependía de la energía específica total aplicada al producto al pasar por la cámara de tratamiento. Por lo tanto, en flujo continuo, la temperatura de tratamiento no es constante por lo que es difícil cuantificar su efecto.

Recientemente el grupo de investigación de Nuevas Tecnologías de Procesado de Alimentos de la Universidad de Zaragoza ha diseñado una cámara estática de electrodos paralelos con los electrodos termostatados que permite investigar la inactivación microbiana por PEAV a distintas temperaturas en condiciones prácticamente isotérmicas (Saldaña *et al.*, 2010). Por lo tanto, la aplicación de los PEAV a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, pero inferiores a las de los actuales tratamientos térmicos abre la posibilidad de aplicación de esta tecnología para la pasteurización de los alimentos líquidos.

Si bien se han presentado los principales parámetros de procesado, a la hora de aplicar los tratamientos PEAV, estos están interrelacionados y cualquier modificación de uno de ellos condiciona los otros. De forma resumida, se presenta a continuación las relaciones entre estos parámetros.

- **Interdependencia entre los diferentes parámetros en el tratamiento PEAV**

La aplicación de un voltaje entre los electrodos genera un campo eléctrico, parámetro fundamental en esta tecnología (1). El campo eléctrico depende, además del voltaje aplicado de la configuración y diseño de la cámara de tratamiento. Como se ha indicado, en una cámara de electrodos paralelos el campo eléctrico es homogéneo y la intensidad se calcula en base a la Ec. 1.1. La aplicación de un voltaje (U) produce una corriente eléctrica (I) debido a la conductividad eléctrica del medio situado entre los electrodos según la ecuación:

$$V = I * R.$$

La resistencia eléctrica (R) de la cámara de tratamiento (2) (Ec. 1.3) depende de las dimensiones de la misma, así como la conductividad eléctrica del medio de tratamiento, y condiciona la intensidad de corriente. Debido a que la conductividad eléctrica depende a su vez de la temperatura, la resistencia de la cámara de tratamiento y la intensidad de corriente variarán si lo hace la temperatura del producto.

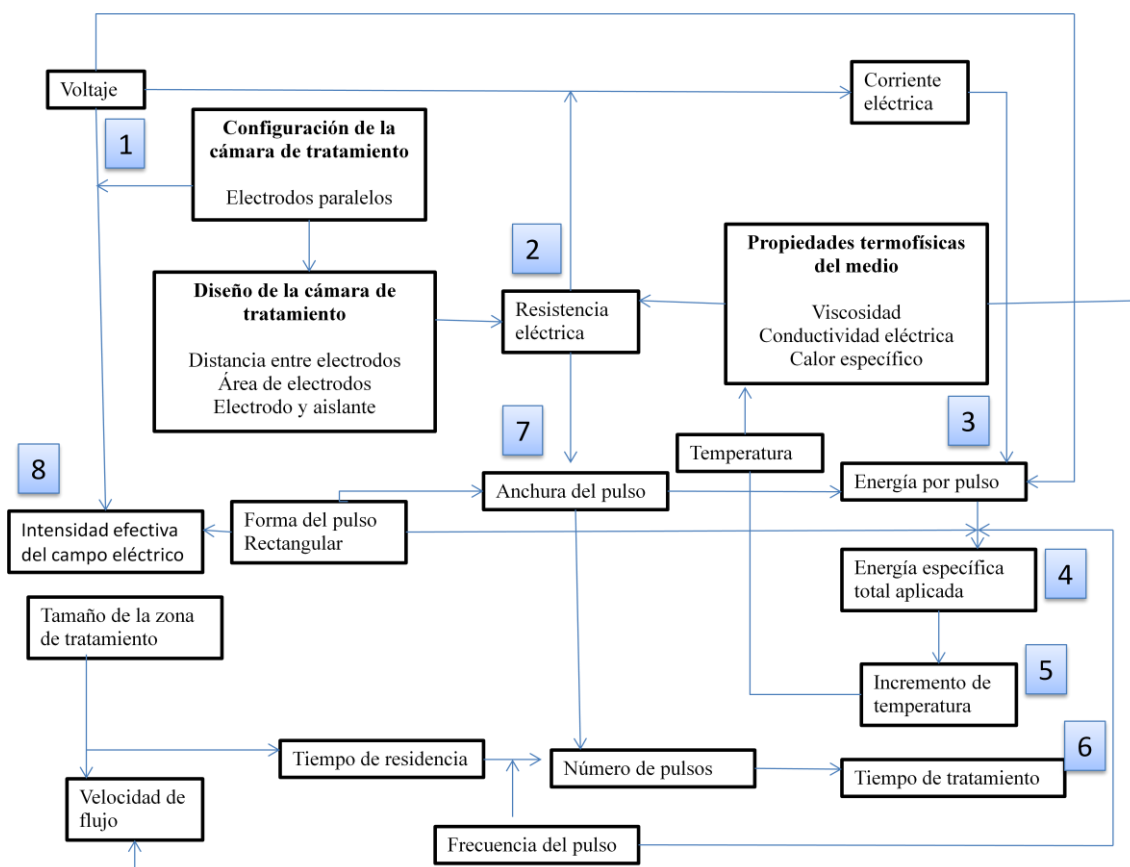


Figura 1.2. Esquema de las diferentes interdependencias de los parámetros del procesado mediante PEAV relacionados con el generador de pulsos, la cámara de tratamiento y el medio de tratamiento. Se ha considerado una cámara de electrodos paralelos y pulsos de onda cuadrada por ser los utilizados en este estudio. Los números hacen referencia al contenido de cada bloque.

Al aplicar un pulso, se libera en el medio de tratamiento una energía eléctrica (Ec. 1.4) (3) y, dependiendo del número de pulsos aplicados, se puede calcular la energía específica total aplicada (Ec. 1.5) (4). En condiciones de flujo continuo, el número de pulsos aplicados depende del tiempo de residencia del producto en la cámara de tratamiento y de la frecuencia de aplicación de los pulsos. La energía total aplicada es un factor a considerar en esta tecnología ya que, además de permitir comparar tratamientos aplicados en diferentes condiciones de tratamiento, se utiliza para estimar

el incremento de temperatura del medio de tratamiento como consecuencia del tratamiento aplicado: La disipación de la energía eléctrica aplicada al producto produce un incremento de la temperatura (5) debido al efecto Joule. Este incremento dependerá a su vez de la capacidad térmica del producto procesado y tendrá un impacto en las propiedades físicas del producto, dependientes tanto de la temperatura como de la conductividad eléctrica, lo que modificará la resistencia eléctrica de la cámara, la intensidad de corriente y el flujo del producto, respectivamente. De esta forma, se inicia un ciclo de interdependencia entre los distintos parámetros del proceso.

Otro parámetro indicado como fundamental en los pulsos PEAV es el tiempo de tratamiento (Ec. 1.2) (6). Dependiendo de las dimensiones y del caudal del producto se puede calcular el tiempo de residencia en la cámara de tratamiento, durante el cual, se aplica un determinado número de pulsos en base a la frecuencia aplicada.

Hay que considerar que si bien en condiciones estáticas y con pulsos de onda cuadrada es un parámetro fácil de definir, en flujo continuo hay una distribución del tiempo de tratamiento en la cámara de tratamiento que no es homogénea, debido a la velocidad del producto y a la distribución del tiempo de residencia, muy condicionados por el diseño de la cámara de tratamiento (Jaeger y col., 2009). Cuando se utilizan pulsos de onda cuadrada tanto la anchura del pulso (7) como la intensidad del campo eléctrico se mantiene constante prácticamente durante toda la duración del pulso. De este modo se habla de intensidad efectiva del campo eléctrico (8) como el campo eléctrico por encima del campo eléctrico crítico requerido para producir electroporación en la célula microbiana. Este campo crítico depende de las características del microorganismo como se verá a continuación (Barssoti y Cheftel, 1999; Wouters y col., 2001a; Monfort, 2012).

Como se observa, hay una compleja interdependencia entre los parámetros de procesado, por lo que no es posible modificar un único parámetro sin afectar a las otras condiciones de procesado. Esta circunstancia, además de condicionar los diseños de las cámaras de tratamiento y el funcionamiento de los equipos de PEAV, es fundamental tenerla presente en las investigaciones sobre la influencia de los distintos factores en la eficacia letal de los tratamientos PEAV. Así, a la hora de evaluar el efecto de un parámetro, los estudios deben realizarse modificando sólo ese factor y manteniendo el resto fijos. Esta circunstancia no se respeta en muchas investigaciones por lo que los resultados obtenidos y sus interpretaciones son en ocasiones contradictorios. (Monfort, 2012).

1.2.2 Características del microorganismo

Se ha indicado que la resistencia microbiana depende de las características propias de los microorganismos como el tipo de microorganismo, las características de sus envolturas celulares, su tamaño o su forma. Como norma general se ha establecido que las bacterias son más resistentes que las levaduras, que los microorganismos Gram-negativos son más sensibles que los Gram-positivos y que los cocos son más resistentes que los bacilos. Sin embargo, estudios posteriores indican que la resistencia intrínseca de cada microorganismo es más importante que sus características. De hecho comparando la resistencia de diferentes microorganismos en las mismas condiciones experimentales se ha observado que algunas levaduras son más resistentes que algunas bacterias, que algunos microorganismos Gram-positivos son más sensibles que algunos Gram-negativos y que algunos bacilos son más resistentes que algunos cocos (Somolinos *et al.*, 2008; Saldaña *et al.*, 2011).

Diferentes estudios han demostrado una gran variabilidad en la resistencia a los PEAV de cepas del mismo microorganismo. Por ejemplo, se ha observado que dependiendo de la cepa y el pH del medio de tratamiento la eficacia letal de un mismo tratamiento sobre distintas cepas de la misma especie bacteriana puede variar desde 0,1 hasta 4,5 Log₁₀ UFC/ml (Saldaña *et al.*, 2009; Arroyo *et al.*, 2010).

También se ha observado que las condiciones de cultivo pueden afectar a la resistencia microbiana a los PEAV (Cebrián, 2009). En general, se observa que los microorganismos en fase de crecimiento exponencial son más sensibles a los tratamientos que en fase estacionaria y que cuando los microorganismos crecen a temperaturas inferiores a la óptima de crecimiento su resistencia también disminuye.

1.2.3. Características del medio de tratamiento

Generalmente, los estudios realizados sobre la inactivación microbiana mediante PEAV se realizan en medios de tratamiento líquidos. Sus características físico-químicas pueden influir en la resistencia microbiana así como en el tratamiento aplicado. Algunos de los factores investigados más importantes son la conductividad eléctrica, el pH o la composición del medio de tratamiento.

La influencia de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento en la inactivación microbiana por PEAV ha sido investigada por diversos autores (Dutreux *et al.*, 2000b; Wouters *et al.*, 2001). Sin embargo, es difícil concluir de estos estudios si realmente la conductividad del medio de tratamiento afecta a la electroporación de los

microorganismos o si los efectos observados son consecuencia de la modificación de la resistencia de la cámara de tratamiento que a su vez influye en la forma del pulso, la intensidad de campo eléctrico y energía específica aplicada. Estudios realizados sobre la influencia de este factor en un rango de conductividades entre 0,5 y 4 mS/cm que se corresponden con las conductividades de la mayoría de los alimentos líquidos, demostraron que la conductividad del medio de tratamiento no afectaba a la resistencia microbiana si se modificaba el voltaje y la anchura de pulso que se seleccionaba para conseguir el mismo campo eléctrico y la misma anchura de pulso independientemente de la conductividad del medio de tratamiento (Álvarez *et al.* 2000).

La influencia del pH del medio sobre la resistencia microbiana a los PEAV ha sido intensamente estudiada. Algunas investigaciones muestran que los microorganismos son más sensibles a pH ácido, otros autores han observado una mayor sensibilidad a pH neutro y, en otras ocasiones, no se ha observado efecto del pH. Generalmente, los microorganismos Gram-positivos son más resistentes a los PEAV en medio de pH neutro mientras que los microorganismos Gram-negativos lo son más en medio de pH ácido. Este diferente comportamiento se ha asociado con la aparición de daños subletales como consecuencia de la aplicación de los tratamientos de PEAV. Así, cuando los microorganismos Gram-positivos son tratados en un medio de pH neutro tienen mayor capacidad de reparar los daños subletales provocados por los tratamientos que cuando se tratan en un medio de pH ácido, mientras que en los microorganismos Gram negativos ocurre lo contrario (García *et al.*, 2005; Somolinos *et al.*, 2008).

Finalmente, también se ha investigado el posible efecto protector o sensibilizante a los tratamientos de PEAV de diferentes componentes de los alimentos. Sin embargo, las distintas condiciones de tratamiento y medios de tratamiento utilizados dificultan la obtención de conclusiones generales a este respecto. Mientras que algunos autores han observado un incremento en la resistencia a los PEAV al aumentar el contenido de grasa en la leche otros no han observado influencia de la presencia de proteína o grasa cuando el tratamiento se ha aplicado en tampones (Reina *et al.*, 1998; Mañas *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha observado un efecto protector del ácido cítrico en la inactivación de *E. coli* por PEAV tanto en tampón como en zumos (Somolinos *et al.*, 2009). Finalmente, el almacenamiento en refrigeración de zumo de manzana tratado por PEAV (25 kV/cm, 400 μ s) permitió observar una reducción de la población de *E. coli* O157:H7 desde 0,7 ciclos logarítmicos hasta 5 log. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de los microorganismos especialmente los Gram negativos en

condiciones ácidas resulta letal cuando estos han sido tratados por los PEAV (Garcia *et al.*, 2005 y 2011). Independientemente de los datos descritos en la literatura, son necesarios más estudios que permitan aclarar los mecanismos por los que se producen estos efectos.

1.3 Inactivación microbiana en alimentos líquidos

La utilización de PEAV para la pasteurización de alimentos data de principios del siglo XX, pero la mayoría de avances se están produciendo en las últimas décadas. Los primeros estudios se realizaron sobre medios de laboratorio y posteriormente en leches y zumos. En cuanto a los aspectos considerados en los estudios, la mayoría de las investigaciones se han centrado en su efecto sobre microorganismos alterantes (Quin *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1997; Ele-Martínez *et al.*, 2005). Algunos estudios demuestran que el tratamiento de zumos mediante PEAV alcanza niveles de destrucción de microorganismos parecidos a los conseguidos por pasteurización térmica en diferentes productos (Min *et al.*, 2003a; Evendrilek *et al.*, 2000; Yeom *et al.*, 2000a; Ele-Martínez *et al.*, 2006b).

La *Food and Drug Administration* (FDA), institución que regula los aspectos de seguridad alimentaria en EE.UU., publicó el 12 de septiembre de 2002 una guía dirigida a las industrias productoras de zumos con los requisitos legales para implantar el APPCC en dichas industrias. Este sistema se aplica con el fin de prevenir, reducir o eliminar cualquier contaminación microbiológica, química o física que pueda sufrir el zumo. Además, la tecnología de procesado utilizada, debe conseguir al menos, una reducción de cinco unidades logarítmicas en la población de un microorganismo patógeno seleccionado para cada tipo de zumo, en función de su mayor resistencia a ser inactivado, pudiéndose emplear métodos distintos al calor en los que están incluidos los PEAV, siempre que consigan dicho nivel de destrucción microbiana.

Si bien existen muchos datos sobre la eficacia letal de los PEAV sobre microorganismos, son escasos los trabajos realizados específicamente en zumo de naranja con el objetivo de destruir microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, que es uno de los microorganismos más resistentes a los tratamientos PEAV. Es decir, no se han establecido los parámetros de procesado que permitan garantizar la inocuidad frente a este microorganismo en este producto mediante la tecnología de los PEAV.

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, no formadora de esporas, anaerobio facultativo y psicrotrofo que es capaz de crecer y sobrevivir en un amplio rango de temperaturas, en condiciones ácidas (Gandhi and Chikindas 2007). Estas circunstancias justifican que se haya aislado en un gran número de alimentos, entre los que se encuentran los zumos de frutas, responsables de infecciones alimentarias (Vojdani et al. 2008). Esto junto con su alta tasa de mortalidad (Farber and Peterkin 2000) lo hacen un microorganismo de referencia desde un punto de vista sanitario.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros con propiedades nutritivas y organolépticas similares al producto fresco, está haciendo que se investigue métodos de inactivación microbiana no térmicos que puedan sustituir a los tratamientos por calor, siendo los PEAV una de estas alternativas. Si bien son numerosas las investigaciones de la eficacia letal de esta tecnología, son escasos los datos sobre la inactivación de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* en alimentos como el zumo de naranja, por lo que no es posible definir las condiciones de tratamiento que permitan garantizar la inocuidad de productos como el zumo de naranja con relación a *L. monocytogenes*.

Es por ello que el **objetivo principal** de este trabajo ha sido investigar la eficacia letal de los tratamientos PEAV sobre *L. monocytogenes* tratada en zumo de naranja y establecer las condiciones de procesamiento necesarias para garantizar la inocuidad del producto en relación a este microorganismo. Para la consecución de este objetivo general, ha sido necesario conseguir los siguientes **objetivos parciales**:

- Estudiar el efecto de los principales parámetros de procesamiento PEAV (campo eléctrico, tiempo de tratamiento y temperatura) en la letalidad de los tratamientos sobre *L. monocytogenes* utilizando como medio de tratamiento zumo de naranja.
 - Describir en base a modelos matemáticos la influencia de los anteriores factores en la inactivación de *L. monocytogenes* en zumo de naranja.
 - Estudiar la resistencia al calor de *L. monocytogenes* en zumo de naranja y describirla mediante el desarrollo de modelos matemáticos.
-

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Medios y reactivos

El agar tripticasa-soja (TSA) y el caldo tripticasa-soja (TSB) fueron suministrados por la casa Oxoid (Basingtok, Hampshire, England) y se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante. Para los cultivos microbianos estos medios se enriquecieron con un 0,6% de extracto de levadura (TSA+YE y TSB+YE, respectivamente) suministrado por la misma casa comercial. El agua de peptona se preparó a partir de peptona de carne (Oxoid) disolviendo un 0,1% (p/v) en agua destilada. Todos los medios, una vez preparados, se esterilizaron 20 minutos a 121°C en autoclave (Darlab K-400, Terrassa, Barcelona), y se almacenaron a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

El medio utilizado para la aplicación de los tratamientos PEAV y de calor fue zumo de naranja (marca comercial?) comprado en un supermercado local. El pH del zumo, medido con un pH-metro con compensación automática de temperatura (modelo basic 20⁺, Crison Instrumental, Barcelona, España), era de 3,5. Y la conductividad eléctrica del mismo, 3,5 mS/cm medido con un conductivímetro (mod. 524, Crison Instrumental, Barcelona, España) a temperatura ambiente.

3.2. Microorganismos

Para llevar a cabo esta investigación, se utilizó la cepa de *Listeria monocytogenes* CECT 5672, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Dicha cepa se eligió por su especial resistencia a los tratamientos de PEAV (Saldaña et al., 2009).

3.2.1. Obtención de la suspensión

La suspensión se preparó siguiendo las etapas que se muestran en la figura 3.1. En esta figura también se indican los diferentes medios, temperaturas y tiempos de cultivo utilizados para el microorganismo.

Para la preparación de la suspensión, se partió del correspondiente criovial que se almacenó a -80°C . La cepa congelada se revitalizó en primer lugar en TSB+YE y, a continuación, se sembró en placas de TSA+YE por agotamiento en estría que se incubaron durante 24 h a 37°C y, posteriormente, se almacenaron en nevera ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$). Esta operación se realizó semanalmente para tener disponibilidad permanente de cultivo fresco. A partir de una colonia aislada de las placas de TSA+YE, se sembraron tubos de ensayo que contenían 5 ml de TSB+YE estéril y se incubaron en estufa durante 18 horas

(Hotcold UL, Selecta, Abrera, España). Tras determinar la concentración celular del precultivo mediante recuentos microscópicos (Y-FL, Nikon, Tokio, Japón) en cámara de Thoma (ServiQuimia, Constantí, España), se inocularon frascos con 50 ml de TSB+YE estéril atemperados a 37°C, con un volumen suficiente para alcanzar una concentración microbiana inicial de 10^6 UFC/ml. Los cultivos se incubaron en estufa con agitación orbital (Agitador vibramax 100, Heidolph Instruments, Acwabach, Alemania) a 37°C. Para establecer los tiempos de incubación para obtener las suspensiones microbianas se elaboró la correspondiente curva de crecimiento.

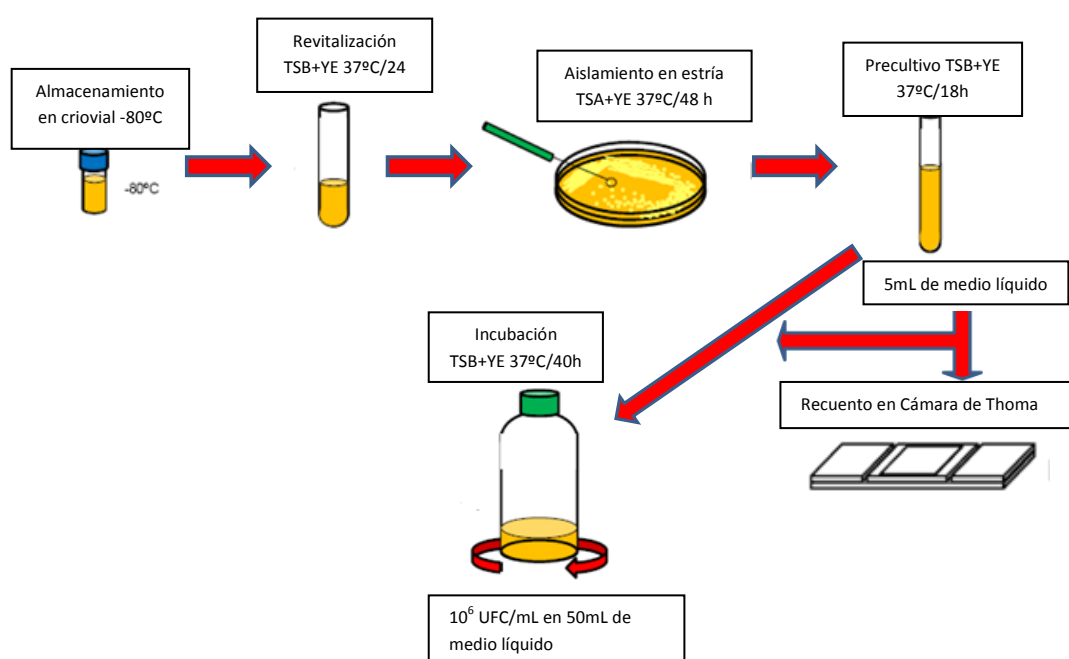


Figura 3.1. Esquema del procedimiento para la obtención de la suspensión microbiana.

3.2.2. Curvas de crecimiento

La curva de crecimiento se elaboró tomando 0,1ml de la suspensión cultivada a 37°C a intervalos determinados de tiempo. Tras realizar las diluciones correspondientes en agua de peptona estéril, se sembraron por duplicado alícuotas de 0,1ml en placas de TSA+YE, por homogeneización en masa y se cultivaron a 37°C/48h. La curva de crecimiento se elaboró representando el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL frente al tiempo (t) de incubación (figura 3.2). Con el fin de caracterizar esta curva de crecimiento, ésta se ajustó al modelo de Gompertz (Zweitering et al., 1990) obteniéndose la siguiente ecuación:

Esta ecuación permite conocer la concentración de *L. monocytogenes* a 37°C a cualquier tiempo de cultivo hasta las 50 h de incubación.

Debido a que la fase de crecimiento es uno de los factores que puede influir en la inactivación a los PEAV, siendo más sensible los microorganismos en la fase exponencial de crecimiento, resultados previos indicaron que la resistencia de *L. monocytogenes* a los PEAV era máxima y constante a partir de las 34 h de incubación a 37°C (Condón, 2013). A la vista de estos resultados, se decidió realizar esta investigación con un cultivo con 40 horas de incubación para *Listeria monocytogenes* 5672 .

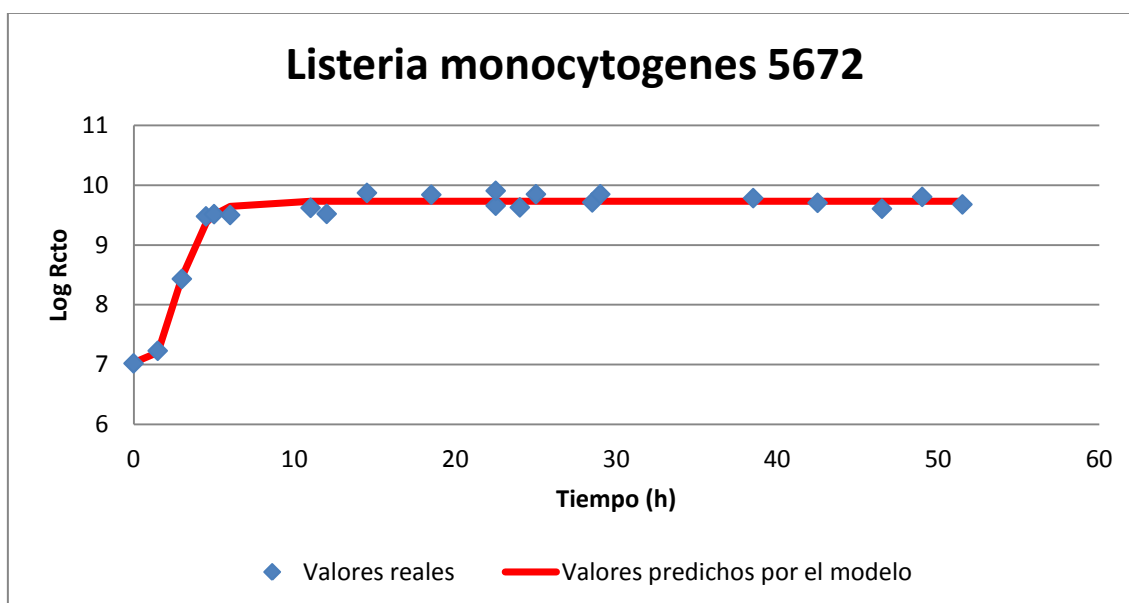


Figura 3.2. Curva de crecimiento a 37°C de *L. monocytogenes* 5672 descrita mediante el modelo de crecimiento de Gompertz.

3.3 Determinaciones de resistencia al calor

Las determinaciones de resistencia al calor se realizaron en el termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993), que permite el control de las condiciones de temperatura y presión aplicadas durante los tratamientos. El equipo consiste en un vaso de acero inoxidable con una capacidad de 350 ml donde se encuentra el medio de tratamiento líquido. Dispone de un sistema de agitación que garantiza un flujo turbulento durante el tratamiento consiguiendo de este modo una temperatura uniforme en todo el volumen tratado, de un sistema de termostatación con lo que se controla la temperatura del medio de tratamiento y un sistema de toma de muestras automático conectado a una válvula solenoide que actúa de cierre. Una entrada de presión dotada de un manómetro y un

manorreductor permite trabajar tanto a presión ambiente como a sobrepresión para aplicar tratamientos por encima de los 100°C.

Antes y después de cada sesión de trabajo se esterilizaron (5 minutos, 125°C) tanto el equipo como el medio de tratamiento (zumo de naranja). Antes de inyectar el microorganismo, 1 mL de zumo era contaminado con el microorganismo que se almacenaba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Con ello, se pretendía adaptar el microorganismo al medio ácido para evitar un choque ácido al introducirlo en el zumo a la temperatura del tratamiento térmico.

Una vez el medio estaba estabilizado a la temperatura de tratamiento se inyectaron 0,2 ml del zumo contaminado con el microorganismo adaptado en la cámara de tratamiento mediante una jeringuilla estéril. Durante el tratamiento y a intervalos determinados de tiempo se extrajeron muestras de 0,1 ml, depositándolas directamente en placas de Petri estériles, a las que inmediatamente se les añadió el medio de crecimiento estéril, fundido y a 45°C, para su posterior incubación.



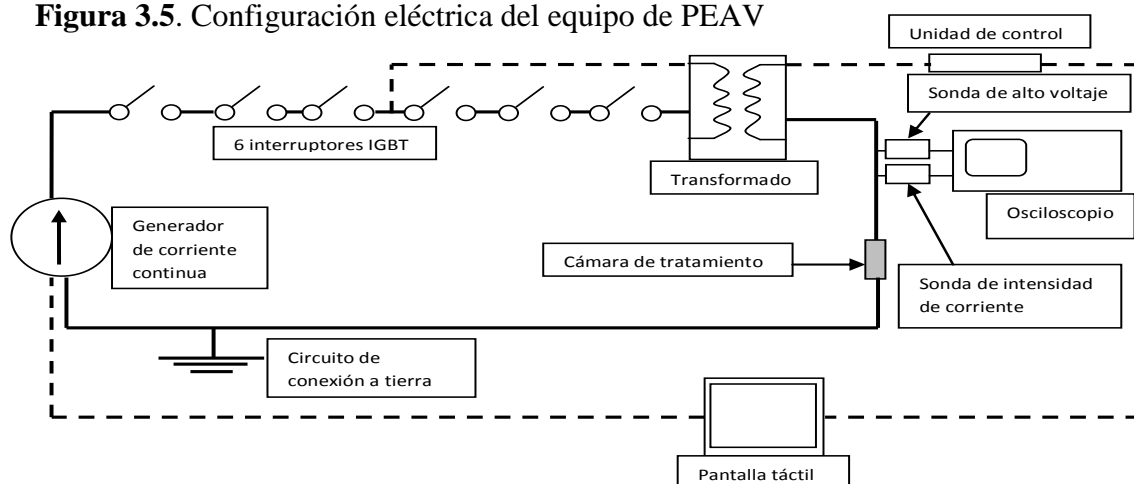
Figura 3.4. Equipo utilizado para la determinación de resistencia al calor

3.4. Tratamiento de PEAV

3.4.1. Generador de pulsos eléctricos

El estudio se realizó con un generador de pulsos eléctricos suministrado por la empresa Scandinova (modulator PG, Scandinova, Uppsala, Suecia) cuyo esquema eléctrico se muestra en la figura 3.3. El equipo consta de un transformador (DCPS D10-400, Scandinova) que convierte la corriente trifásica alterna de la red eléctrica (380V 16A) en corriente continua de 1kV. Una señal eléctrica externa controla la apertura y el cierre de seis interruptores IGBT (Switch rack SR-6, Scandinova). Los pulsos de onda cuadrada de un voltaje de 1kV generados por los interruptores se amplifican por un transformador en la señal de alto voltaje deseada. Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3μs de duración, de hasta 30kV de voltaje y 200A de intensidad, a una frecuencia de hasta 200Hz.

Figura 3.5. Configuración eléctrica del equipo de PEAV



El equipo está diseñado para trabajar en condiciones óptimas con una resistencia en la cámara de tratamiento de entre 100 y 170 Ω . En estas condiciones, se consigue un pulso cuadrado en el que el voltaje aumenta hasta el valor establecido a una velocidad de 47 kV/ μ s, y una vez transcurridos los 3 μ s la velocidad de caída es de 56 kV/ μ s. Sin embargo, cuando la resistencia de la cámara es menor de 100 Ω o mayor de 170 Ω la forma del pulso cambia y el control de las condiciones de tratamiento, tales como la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la energía específica, es menos preciso. La necesidad de trabajar en este rango de resistencias obliga a ajustar las dimensiones de la cámara de tratamiento en función de la conductividad de la muestra que se desee tratar.

El equipo cuenta con un sistema de refrigeración con aceite dieléctrico de baja conductividad donde está sumergido el transformador. Este aceite se enfría en un intercambiador de calor por el que circula agua a temperatura ambiente. El flujo mínimo del intercambiador debe ser 9 L/min, a una presión de entre 3 y 8 bares. El control del equipo se realiza mediante un software específico diseñado por la empresa fabricante (K1-15m, Scandinova). Además, el equipo cuenta con un interruptor manual de seguridad que desconecta el circuito y permite manipular con seguridad los diferentes componentes externos.

Para conocer y registrar el voltaje y la intensidad de corriente realmente aplicados, y así conocer las condiciones reales de tratamiento, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix, Wilsonville, Oregon, EE.UU.) y otra de intensidad de corriente (Stangenes Industries, Palo alto, California, EE.UU.) conectadas a un osciloscopio digital de dos canales (TDS 220, Tektronix).

3.4.2. Cámaras de tratamiento

3.4.2.1 Cámara de tratamiento en condiciones estáticas.

Dados los objetivos de esta investigación, fue necesario utilizar un sistema de termostatación de la cámara de tratamiento que permitiera aplicar tratamientos a distintas temperaturas en condiciones isotérmicas. Para ello, se utilizó la cámara de tratamiento descrita por Saldaña *et al.* (2010) modificándose el sistema de termostatación y el procedimiento para la aplicación de los tratamientos, según estudios anteriores realizados en este centro (Condón, 2013), para poder evaluar la influencia de la temperatura en el efecto letal de los PEAV en un amplio rango de trabajo.

La cámara está constituida por un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable de 1,6 cm de diámetro y 4 cm de longitud. La distancia de separación entre los electrodos era de 2,5 mm, lo que da un volumen efectivo de tratamiento de unos 0,5ml. El interior de los electrodos es hueco, de manera que se pueden atemperar haciendo circular aceite dieléctrico de baja conductividad (1,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$) a distintas temperaturas. La descripción y caracterización del **sistema de termostatación** de la cámara de tratamiento PEAV en condiciones isotérmicas se describe en el **Anexo I** y constituyó una parte de este trabajo de fin de grado.

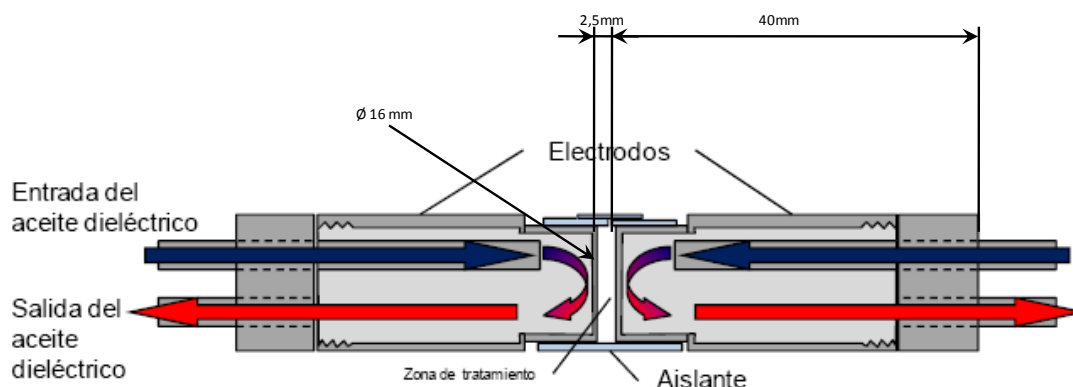


Figura 3.6. Esquema de la cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos termostatados (Saldaña, 2012).

3.4.2.2. Cámara de tratamiento en flujo continuo

Para realizar los estudios de la eficacia letal de los PEAV en flujo continuo, se utilizó una cámara de electrodos paralelos cuyas características principales se muestran en la Tabla 3.2. Esta cámara, diseñada por el grupo de investigación Nuevas Tecnologías de Conservación de Alimentos de la Universidad de Zaragoza, consta de dos electrodos planos de acero inoxidable separados 5,73 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 5,73 mm, una altura de 0,5 cm y una longitud de 3,9 cm en la que el campo eléctrico generado es perpendicular a la dirección de flujo del producto. El volumen total de tratamiento es de 1,17 mL. Utilizando un flujo de producto de 3 L/h, el tiempo de residencia medio del producto en la zona de tratamiento es de 1,44 s. En estas condiciones, el número máximo de pulsos que es posible aplicar es de 260.

Es en esta investigación la primera vez que se utilizó esta cámara de tratamiento. Debido a que se diseñó para productos con una conductividad eléctrica de 2,1 a 2,5 mS/cm, el zumo de naranja (3,5-3,7 mS/cm) tuvo que ser diluido mediante la adición de con tampón pH 3,5 y 1mS/cm de conductividad, hasta conseguir una conductividad de 2,2 mS/cm en el medio de tratamiento. Como se ha indicado en la introducción, este cambio de conductividad eléctrica no condiciona la eficacia letal de los tratamientos PEAV aplicados. 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 naranja de 2,2 mS/cm es de 30 kV/cm, aunque en esta investigación nunca fue mayor de 21 kV/cm debido a la formación de arcos eléctricos a campos más elevados.

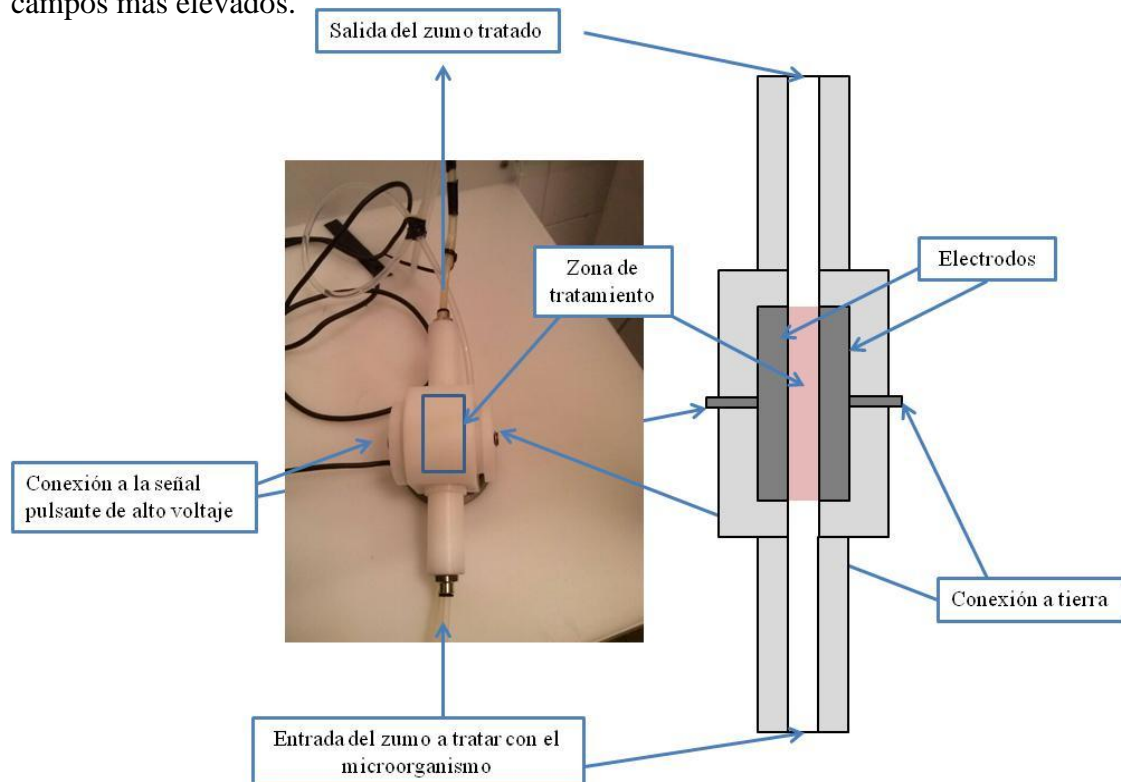


Figura 3.7. Esquema de la cámara de tratamiento PEAV en flujo continuo.

Tabla 3.2. Características de la cámara de electrodos paralelos utilizada en flujo continuo en este estudio.

Distancia entre los electrodos	5,7 mm
Longitud del electrodo	3,9 cm
Área de tratamiento	1,95 cm ²
Volumen total de tratamiento	1,1 mL
Tiempo de residencia	1,4 s
Rango de conductividad	2,1 a 2,5 mS/cm
Campo eléctrico máximo	30 kV/cm
Número de pulsos máximo	260 pulsos de 3µs

3.4.3 Configuración del equipo para el tratamiento en flujo continuo

La instalación para la aplicación de los tratamientos de PEAV en flujo continuo consistió en un depósito de 2 L que contenía el medio de tratamiento (zumo de naranja), una bomba de impulsión, un intercambiador de calor, la cámara de tratamiento y un depósito de 3 L con agua y hielo para enfriar el medio de tratamiento hasta su recogida posterior inmediata (Figura 3.8). 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 (Øinterno 2 mm, Øexterno 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 circulaba hasta un vaso con hielo y agua donde se enfriaba para ser recogido inmediatamente en tubos Eppendorf estériles. La temperatura del medio de tratamiento se medía con sondas termopar tipo “K” (Testo GmbH, Lenzkirch, Alemania) colocadas a la entrada y salida de la cámara de tratamiento.

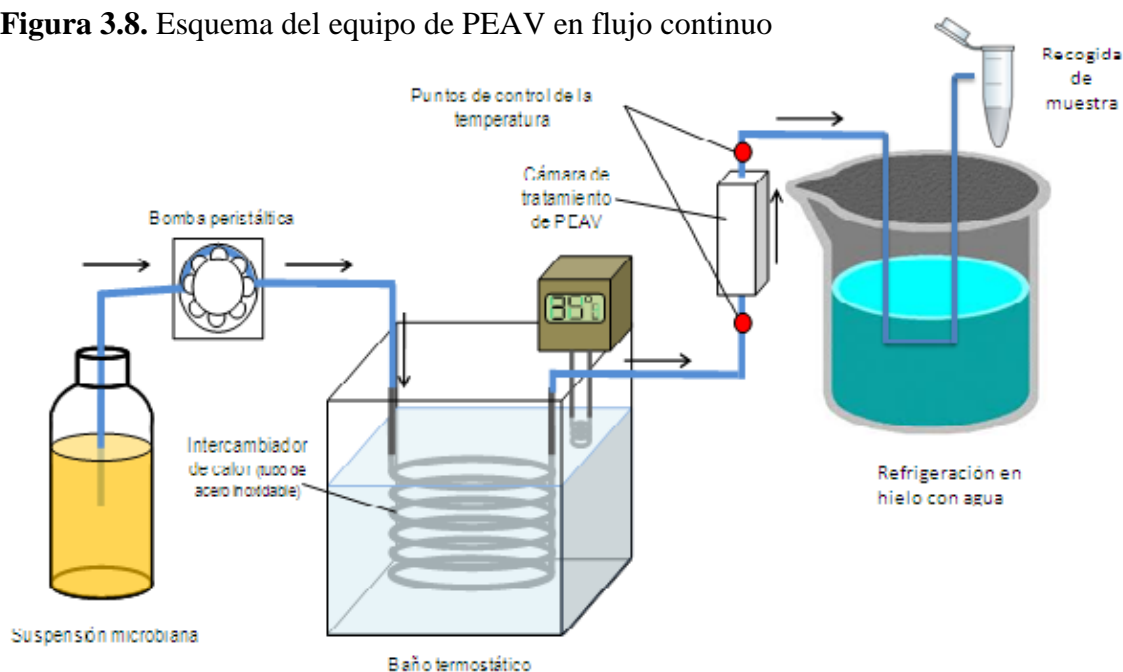
3.5. Metodología para la aplicación de los tratamientos de PEAV

3.5.1 Metodología seguida para el tratamiento de PEAV en flujo estático

Para la aplicación de los tratamientos de PEAV a distintas temperaturas, 10 µl de la suspensión microbiana se añadían a 990 µl del medio de tratamiento previamente atemperado a la temperatura de trabajo en un incubador de placas microtiter (Incubador FX, A.F. ingeniería S.L., Valencia). De esta manera, se conseguía un calentamiento prácticamente instantáneo de los microorganismos a la temperatura de trabajo. La

suspensión atemperada se introducía con una jeringuilla estéril en la cámara de tratamiento que, a su vez, tenía los electrodos atemperados a la temperatura de trabajo. De esta manera, en un tiempo de alrededor de 30 segundos, la suspensión microbiana estaba acondicionada a la temperatura a la que se aplicaban los tratamientos de PEAV a distintas temperaturas. Tras el correspondiente tratamiento de PEAV, se extraía el contenido de la cámara de tratamiento con una jeringuilla estéril y se procedía a su dilución con el diluyente a temperatura ambiente. El esquema de esta metodología se presenta en la figura 1 del **Anexo II**. Para este estudio, se aplicaron entre 1 y 30 pulsos de 3 μ s de anchura de pulso a una frecuencia de 0,5 Hz y campos eléctricos de 30 kV/cm. El medio de tratamiento era zumo de naranja termostatado a 20, 30 y 40°C.

Figura 3.8. Esquema del equipo de PEAV en flujo continuo



3.5.2 Metodología seguida para el tratamiento de PEAV en flujo continuo

Para los tratamientos en flujo continuo, se centrifugaron 2 mL de suspensión microbiana a 10000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 2 L de zumo de naranja. El zumo inoculado con la suspensión microbiana a una concentración de 10^6 UFC/mL, se bombeaba hacia la cámara de tratamiento para recibir el correspondiente tratamiento de PEAV. Tras recorrer la sección de enfriamiento, se recogía 1 mL de muestra en tubos Eppendorf estériles.

Para la investigación, se aplicó un tratamiento de intensidad de campo eléctrico de 21 kV/cm, a distintos tiempos de tratamiento que variaban entre 23 y 105 μ s, modificando para ello la frecuencia de aplicación de los pulsos, desde 3 a 19 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 30, 35 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 35 a $60 \pm 1^\circ\text{C}$. Aunque el objetivo era aplicar campos eléctricos de hasta 30 kV/cm para comparar los resultados con los obtenidos en condiciones estáticas, no fue posible superar los 21 kV/cm sin que se produjese la ruptura dieléctrica del medio de tratamiento.

3.6. Incubación y recuento de supervivientes

Tras realizar las correspondientes diluciones decimales de las muestras en agua de peptona, se sembraron 0,1 ml en placas Petri a las que se adicionaba TSA+EL. Tras la siembra, las placas se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Tiempos más largos de incubación no afectaban al número de microorganismos recuperados tras el tratamiento.

3.6.1. Recuento de supervivientes

El recuento de los microorganismos se efectuó mediante un contador automático de colonias (mod. Protos, *Analytical Measuring Systems*, Cambridge, Reino Unido), adaptado para el conteo de placas densamente pobladas en anteriores investigaciones (Condón *et al.*, 1996).

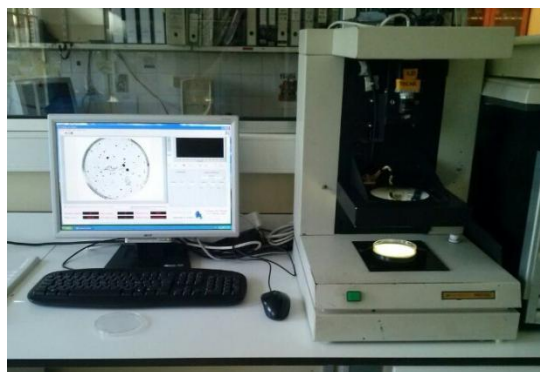


Figura 3.9. Contador automático de colonias

3.7 Análisis estadísticos de los resultados

La letalidad de los tratamientos aplicados (PEAV y calor) se determinó a partir del logaritmo decimal de la fracción de supervivientes. Dicha fracción de supervivientes se obtuvo como el cociente entre los recuentos de los microorganismos supervivientes en las muestras tratadas y en las no tratadas.

En el caso de los **tratamientos térmicos**, a partir de los datos obtenidos para un determinado tratamiento térmico, se obtuvieron las correspondientes gráficas de supervivencia para los microorganismos seleccionados, representando el número de ciclos logarítmicos de inactivación frente al tiempo de tratamiento. La letalidad de los tratamientos térmicos se determinó con el valor del tiempo de reducción decimal (valor D_T), el cual se define como los minutos de tratamiento, a una determinada temperatura

(T), para que el número de supervivientes se reduzca en un ciclo logarítmico. Los valores D_T se calcularon a partir de la inversa de la pendiente de la línea de regresión de la porción lineal de las gráficas de supervivencias. Las gráficas de termodestrucción se obtuvieron representando el logaritmo decimal de los valores D_T frente a la temperatura de tratamiento. A partir de la inversa de la pendiente de la línea de regresión de estas curvas se obtiene el otro parámetro que definió la termorresistencia de los microorganismos, el valor z (número de °C que debe aumentar la temperatura para que el valor D_T se reduzca en un ciclo logarítmico).

La inactivación microbiana por los **tratamientos de PEAV** en continuo se describió en base del tiempo, energía y temperatura final mediante regresión múltiple utilizando el programa Essential Regression del software Excel. Las relaciones fueron descritas por modelos polinomiales.

Para determinar la precisión de los ajustes, se utilizó el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz cuadrada del error cuadrático medio (ECM), calculados con el mismo software. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado utilizando suspensiones obtenidas en distintos días de trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se proponen los PEAV como sistema alternativo a la pasteurización térmica y para ello se trabaja sobre patógenos de referencia en cada producto consiguiendo un determinado nivel de inactivación. Los patógenos propuestos por la FDA, para considerar una pasterización de 5 ciclos logarítmicos en zumos, no están definidos por lo que estudios anteriores (Saldaña, 2010) han permitido identificar cepas de patógenos más resistentes a PEAV en distintos medios de laboratorio. Entre ellos se encuentra *Listeria monocytogenes* 5672 pero apenas hay datos en alimentos de este microorganismo. Por otro lado, la letalidad de los PEAV a temperatura ambiente es limitada o se requieren tratamientos muy intensos poco aplicables industrialmente por lo que los PEAV se están aplicando a temperaturas por encima de la ambiente ya que se ha visto que aumenta la letalidad de los PEAV o que permiten reducir la intensidad de los tratamientos para alcanzar un determinado nivel de inactivación.

Normalmente, el estudio del efecto de la temperatura se ha realizado en procesos en flujo continuo donde la temperatura no es constante por lo que no se sabe con precisión el efecto de los PEAV a distintas temperaturas y este se mezcla con la muerte por el calor. Recientemente, se han realizado estudios del efecto de los PEAV y temperatura

en estático en condiciones isotérmicas, pero en medios de laboratorio. No hay datos sobre la influencia de la temperatura en condiciones controladas en alimentos, así como en proceso en continuo, en la eficacia letal de los PEAV.

Debido a que el objetivo principal de esta investigación era evaluar la influencia de la temperatura sobre la eficacia letal de los PEAV, en una primera parte se ha investigado su efecto en las condiciones más controladas posible (cámara estática de electrodos paralelos y termostatada) para determinar el potencial de la tecnología y, en una segunda etapa, se ha realizado el estudio en flujo continuo simulando el proceso industrial. Debido a que en condiciones de flujo continuo, la temperatura no es constante y se pueden alcanzar temperaturas letales, en primer lugar fue necesario caracterizar la termorresistencia de *L. monocytogenes* en el zumo.

4.1. Inactivación por calor.

La figura 4.1 muestra las gráficas de supervivencia de *L. monocytogenes* obtenidas a distintas temperaturas en zumo de naranja. Como se observa, la cinética de inactivación fue de tipo exponencial lo que permite calcular los correspondientes valores D_t con los que se construyó la gráfica de termodestrucción (Figura 4.2). A partir de esta gráfica, se calculó el valor z de 5,5°C que es un valor similar al obtenido por otros autores en otros medios de tratamiento (Pagán, 1997; Mañas, 1999; Cebrián 2009).

Sabiendo que la muerte por calor está descrita por la ecuación:

$$N_t/N_0 = -t/D_t$$

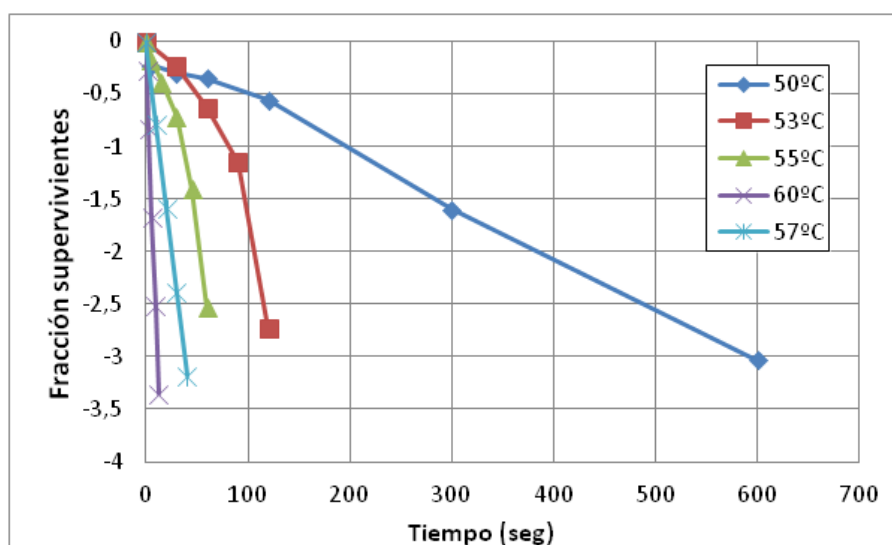


Figura 4.1. Gráficas de supervivencia de *L. monocytogenes* en zumo de naranja obtenidas a diferentes temperaturas.

Y que el valor z se puede expresar como:

$$Z = (T_2 - T_1) / (\log D_{T1} - \log D_{T2}),$$

la muerte microbiana por calor puede describirse con la siguiente ecuación matemática:

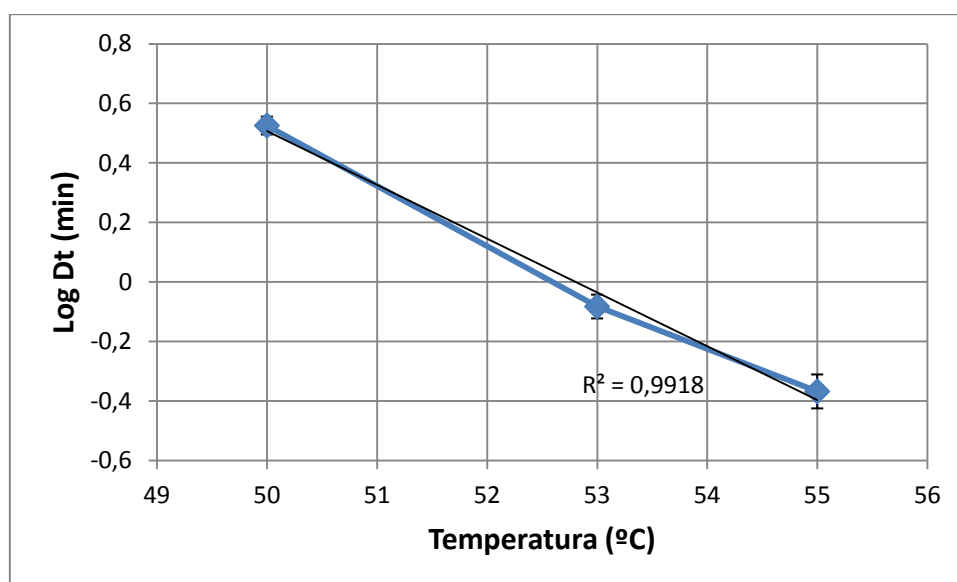
$$\log N_t/N_0 = -t / (D_{Tref} \cdot 10^{((T_{ref} - T)/z)})$$

Considerando un valor $D_{55^\circ C}$ como referencia de 29", para *Listeria monocytogenes* en zumo de naranja, esta ecuación (Ec. 4.1) sería:

$$\log N_t/N_0 = -t / (29 \cdot 10^{((55 - T)/5,5)}),$$

donde el tiempo está expresado en segundos y la temperatura en °C. Esta ecuación permite determinar la muerte de *Listeria monocytogenes* 5672 en zumo de naranja en un rango de temperaturas de 50 a 60°C.

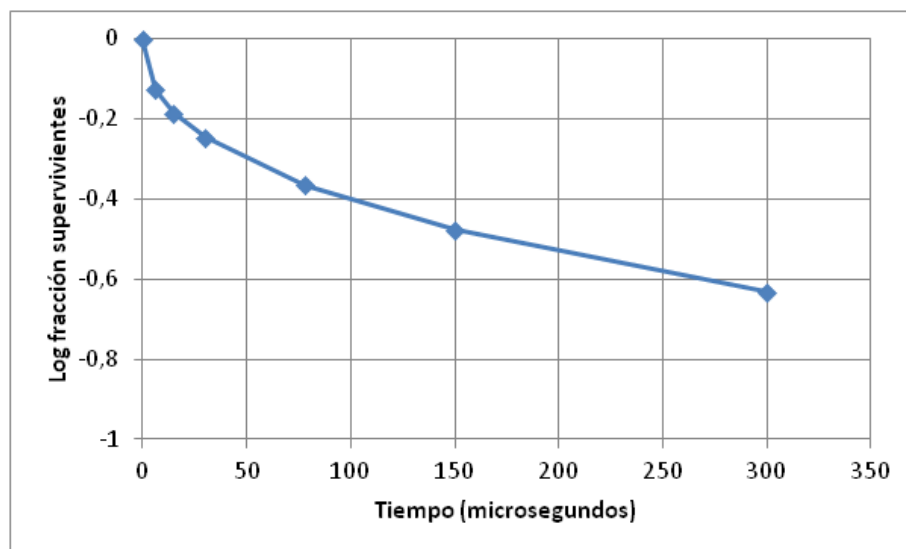
Figura 4.2. Gráfica de termodestrucción de *L. monocytogenes* en zumo de naranja.



4.2. Inactivación por PEAV y temperatura en condiciones estáticas.

Resultados preliminares sobre la inactivación de *L. monocytogenes* en tampón de pH 3,5 (el mismo que el del zumo de naranja), a temperatura ambiente (Saldaña 2011), mostraron que los PEAV (21,5 kV/cm) por sí solos apenas conseguían inactivar 0,6 ciclos logarítmicos con tratamientos excesivamente prolongados (300 µs) y apenas 0,4 ciclos tras 78 µs (Figura 4.3). Estos niveles de inactivación son totalmente insuficientes para conseguir obtener un producto inocuo frente a *L. monocytogenes*, por lo que se hace necesario incrementar la eficacia letal de los PEAV.

Figura 4.3. Gráfica de supervivencia de *L. monocytogenes* en tampón de pH 3,5 tratado por PEAV a 21,5 kV/cm (datos Saldaña, 2011).



Como se ha comentado, una estrategia que permite aumentar la letalidad de los PEAV es aplicarlos a temperaturas subletales. Para evaluar este efecto, se aplicaron tratamientos de 1 pulso en condiciones estáticas controladas. La aplicación de un solo pulso era minimizar el aumento que supone la aplicación de PEAV en el zumo y evitar daños térmicos en los microorganismos. Así, la figura 4.4 muestra los ciclos de inactivación de *L. monocytogenes* con 1 pulso de 30 kV/cm aplicados en zumo de naranja a distintas temperaturas. A modo comparativo, se muestra la inactivación en tampón de igual pH. Se observa que la inactivación aumenta con la temperatura. Entre 20 y 30°C casi no hay efecto y a partir de 30°C este aumenta notablemente. Este efecto fue similar a los datos observados en tampón. Debido a problemas técnicos, no se pudieron aplicar tratamientos por encima de 40°C en el zumo a diferencia de lo que sucedía en tampón. Es por ello que posiblemente la inactivación en zumo a temperaturas superiores sea similar observándose que incrementando la temperatura inicial hasta 57°C se puede prácticamente inactivar 5 unidades logarítmicas de *L. monocytogenes* con un solo pulso. Sin embargo, debido a la dificultad de aplicar tratamientos a temperaturas iniciales por encima de 40°C en el zumo (posiblemente debido a la conductividad eléctrica elevada o a una desgasificación del zumo que formaba burbujas con el tiempo) en estático y viendo el enorme efecto de los tratamientos en tampón de pH ácido, se aplicaron tratamientos en **flujo continuo** utilizando como temperatura inicial máxima

40°C, también para evitar muerte por calor. Por otro lado, la aplicación en continuo permitirá obtener resultados más próximos al tratamiento industrial por esta tecnología.

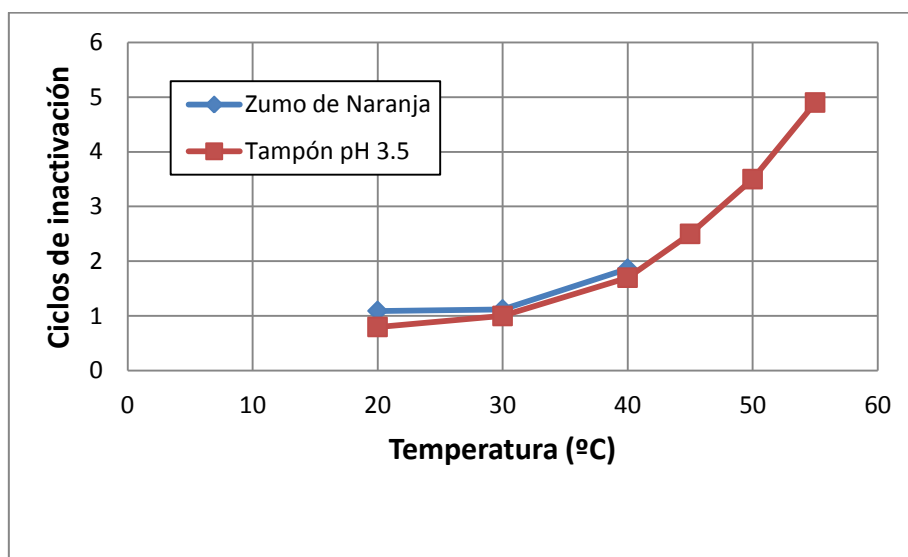


Figura 4.4. Inactivación de *L. monocytogenes* 5672 tras un tratamiento de PEAV con 1 pulso a diferentes temperaturas iniciales y en dos medios de tratamiento diferentes.

Debido al efecto Joule por el cual al aplicar pulsos, la energía liberada se transforma en energía, cada pulso que se dé, será a una mayor temperatura por lo que esto permitirá evaluar el efecto de la temperatura por encima de los 40°C. Y como se ha dicho, al ser los tratamientos PEAV en continuo tan cortos (1,4” según la tabla 3.2), se da poca oportunidad a que el calor sea el que destruya a los microorganismos predominando el efecto de los PEAV en la muerte microbiana. Por otro lado, en estático, el tiempo de aplicación de los tratamientos puede ser de unos 2 minutos y dependiendo de la sensibilidad al calor, puede haber muerte microbiana por calor y no por PEAV; es por ello que interesa aplicar los tratamientos PEAV lo más rápido posible para que el calor no sea el principal responsable de la muerte microbiana.

4.3. Inactivación por PEAV y temperatura en condiciones de flujo continuo.

La figura 4.5 muestra el nivel de inactivación conseguido en *L. monocytogenes* tras la aplicación de PEAV de 21,5 kV/cm a distintos niveles de energía (kJ/kg) aplicando los tratamientos a diferentes temperaturas iniciales en zumo de naranja. Según estos resultados se observa que la muerte aumenta con la energía aplicada a todas las temperaturas iniciales. Para una misma energía PEAV aplicada, la muerte es mayor cuanto mayor es la temperatura inicial. Por ejemplo, para 75 kJ/kg, la inactivación incrementó de 2,6 Log₁₀ a 30°C hasta los 4,3 Log₁₀ a 40°C. Estos resultados confirman

lo observado en condiciones estáticas; y es que cuando mayor es la temperatura inicial de tratamiento mayor es la muerte alcanzada. Por otro lado, para conseguir un mismo nivel de inactivación, resulta más interesante aplicar PEAV a temperaturas más elevadas ya que la cantidad de energía PEAV aplicada es menor. Por ejemplo, para conseguir una inactivación de 3 Log₁₀ es necesario una energía de 50, 57 y 90 kJ/kg cuando la temperatura inicial era de 40, 35 y 30°C respectivamente.

Debido a que la energía aplicada por PEAV se transforma en calor de forma prácticamente adiabática, los resultados anteriores se pueden expresar en función de la temperatura del zumo a la salida de la cámara de tratamiento PEAV (Fig 4.6). Esta nueva representación de los datos da una idea de la temperatura final que se está alcanzando tras los tratamientos y si se está produciendo muerte por calor y no por efecto de los PEAV.

Como se observa, la muerte aumenta con la temperatura prácticamente de forma lineal a las tres temperaturas iniciales investigadas. Sin embargo, si se determina la pendiente de esas rectas (0,24, 0,19 y 0,12 a 40, 35 y 30°C, respectivamente), ésta aumenta cuando la temperatura inicial es mayor, es decir, el efecto de la temperatura es más marcado en la letalidad cuanto mayor es la temperatura inicial. La consecuencia es que para una determinada temperatura resulta mejor trabajar a mayor temperatura inicial ya que permitirá alcanzar mayor inactivación con menor temperatura final y con mejora gasto energético según se ha concluido de la figura 4.5.

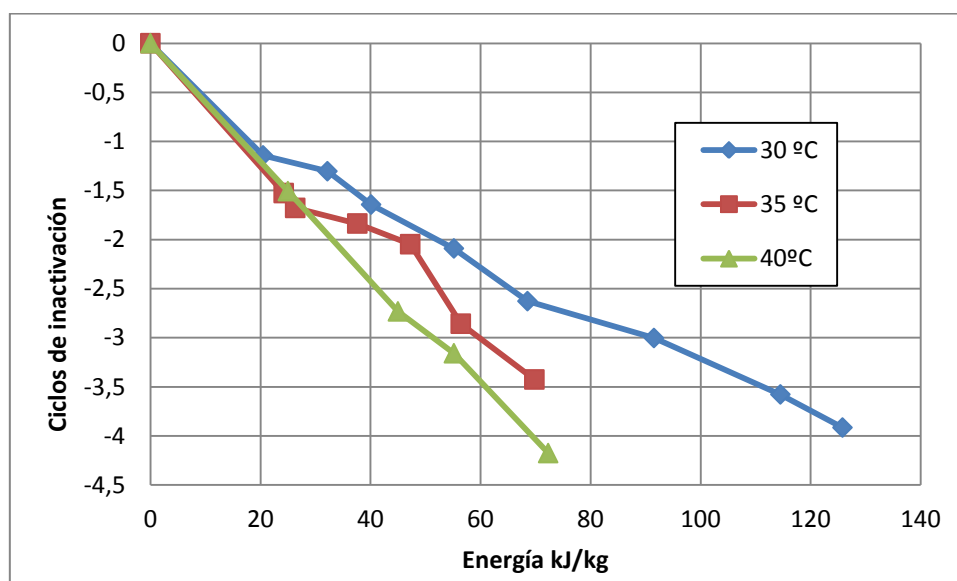


Figura 4.5 Inactivación de *L. monocytogenes* en zumo de naranja mediante un tratamiento PEAV en flujo continuo a diferentes temperaturas.

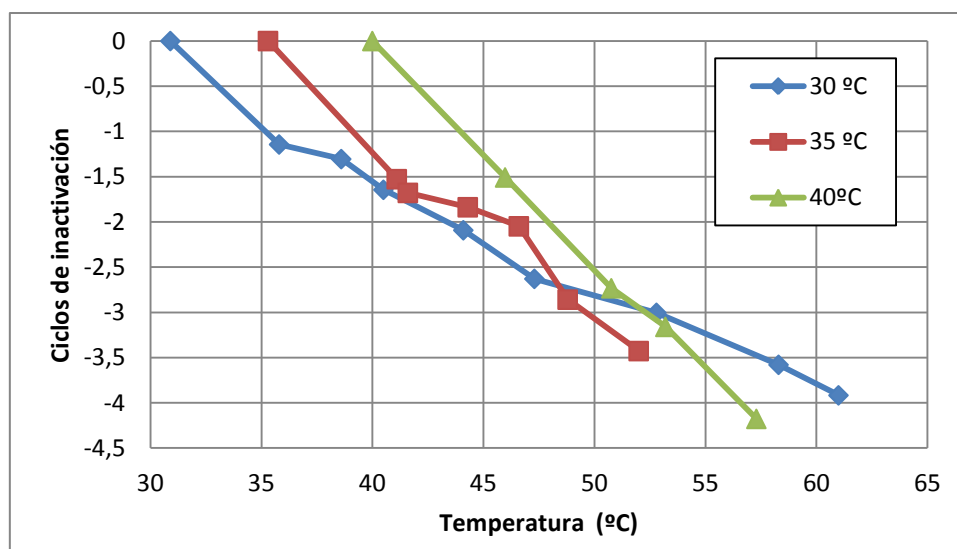


Figura 4.6. Efecto de la temperatura inicial en la inactivación del tratamiento por PEAV en *L. monocytogenes*.

Debido a que uno de los objetivos de esta investigación era evaluar el efecto de la temperatura en la muerte por PEAV y determinar en el proceso combinado la contribución del calor y de los PEAV en la muerte microbiana, se trató de investigar este punto. Como se observa en las figuras anteriores, durante los tratamientos PEAV, se alcanzan temperaturas finales que pueden resultar letales según los datos de resistencia al calor. Es decir, en los datos de inactivación obtenidos puede haber un porcentaje de muerte por calor, más aún sabiendo que desde que el zumo sale de la cámara de tratamiento hasta que se enfría, se pueden pasar por temperaturas letales durante algunos segundos. A modo de ejemplo, la figura 4.7 muestra un perfil de temperaturas (línea azul) en el circuito utilizado para aplicar los PEAV mostrando en la figura 3.8, en este caso por ejemplo para un tratamiento PEAV a una temperatura inicial de 40°C.

Como se observa, se alcanzan temperaturas durante el tratamiento que pueden ser letales (en el ejemplo, hasta 57°C a la salida de la cámara y permanece a ésta durante 4'' hasta que entra en la sección de enfriamiento). En base al modelo de muerte por calor (Ec. 4.1), se puede determinar la muerte debido al calor en este circuito considerando los tiempos y temperaturas a los que está el zumo. Como se observa, el calor durante esos tiempos y temperaturas apenas reduce 0,3 Log_{10} de *L. monocytogenes*. Sin embargo, cuando se considera la muerte con PEAV a las distintas temperaturas, se observa claramente el incremento de la eficacia letal del proceso combinado basado en los PEAV. La aplicación de 21,5 kV/vm y 26 pulsos (78 μs) iniciado a 40°C y

finalizado a 57°C, permitió inactivar 4 Log₁₀. El mismo tratamiento PEAV en estático sin incrementar apenas la temperatura redujo 0,4 Log₁₀ (figura 4.3). Es decir, se observó un **efecto sinérgico** de 3,3 Log₁₀ de inactivación al aplicar PEAV a temperaturas subletales. Estos resultados se muestran más claramente en la figura 4.8. Este efecto sinérgico podría ser debido a que al aumentar la temperatura, se produciría una modificación de la fluidez de la membrana citoplasmática que haría más sensible a los microorganismos frente a los PEAV.

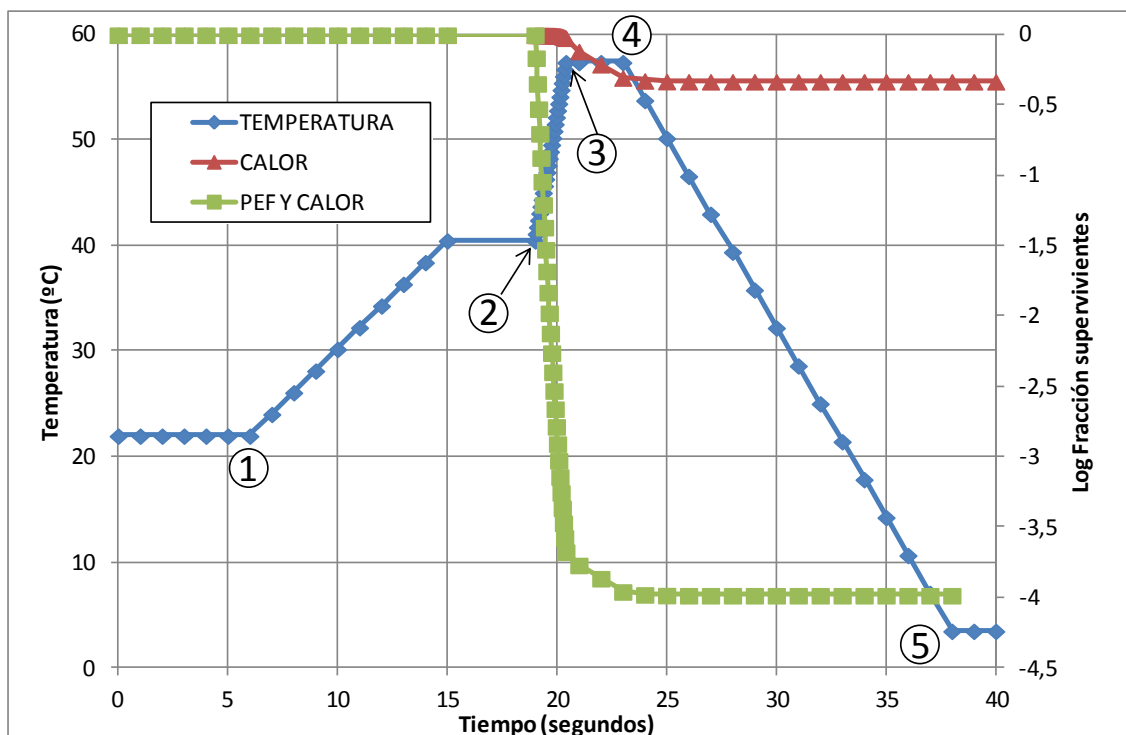


Figura 4.7. Perfil de temperaturas en el circuito (línea azul) utilizado para aplicar los PEAV en continuo, aplicando una temperatura inicial de 40°C, inactivación debida al calor (línea roja) y a los PEAV (línea verde) de *L. monocytogenes* en zumo de naranja. 1. Entrada a la sección de precalentamiento. 2. Entrada cámara PEAV. 3. Salida cámara PEAV. 4. Entrada a la sección enfriamiento. 5. Salida de la sección enfriamiento.

Teniendo en cuenta los datos de muerte obtenidos por PEAV y calor mostrados en la figura 4.5 y la muerte producida por el calor en todo el circuito, se puede determinar lo que matarían sólo los pulsos (descontando la muerte por calor) por diferencia entre ambas inactivaciones como se muestra en la Figura 4.9. Como se observa, a partir de una determinada temperatura, la muerte debida a los PEAV (en verde) se reduce ya que la muerte por el calor aumenta predominando a temperaturas de 60°C. La gráfica corresponde a la inactivación cuando la temperatura inicial es de 30°C. Gráficas similares se pueden obtener a las otras temperaturas iniciales.

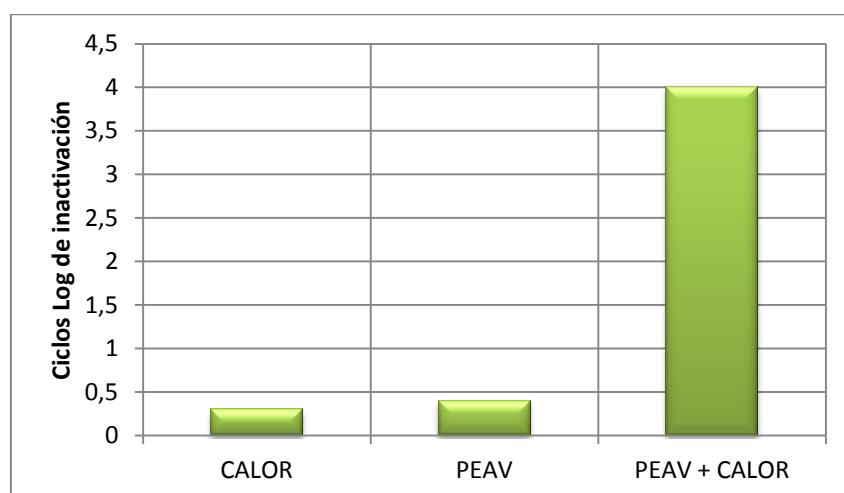


Figura 4.8. Inactivación por calor de *L. monocytogenes* a lo largo de todo el circuito, por PEAV en estático (21,5 kV/cm 78 μ s) y por PEAV en continuo (21,5 kV/cm 78 μ s) para una temperatura inicial de 40°C y final de 57°C.

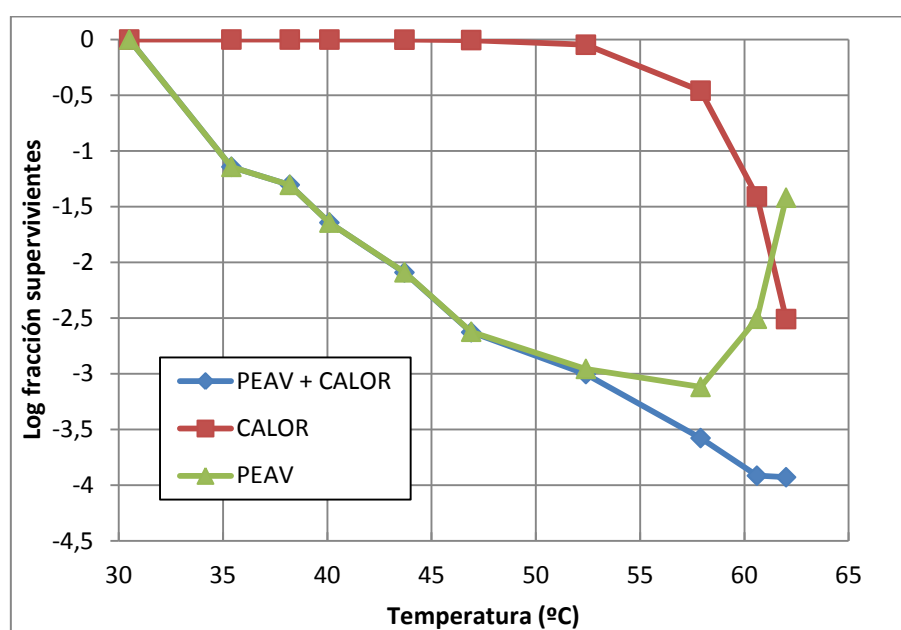


Figura 4.9. Inactivación de *L. monocytogenes* en función del calor (rojo), PEAV y temperatura (azul) y sólo PEAV (verde).

Gracias a la Ec. 4.1 que describe la muerte por calor, se puede representar de nuevo la Figura 4.5 descontando la inactivación producida por el calor y, por tanto, obtener la letalidad de *L. monocytogenes* en zumo sólo por el efecto de los PEAV aplicado a las distintas temperaturas. Las conclusiones que se puedan obtener de esta gráfica son las mismas que las ya indicadas.

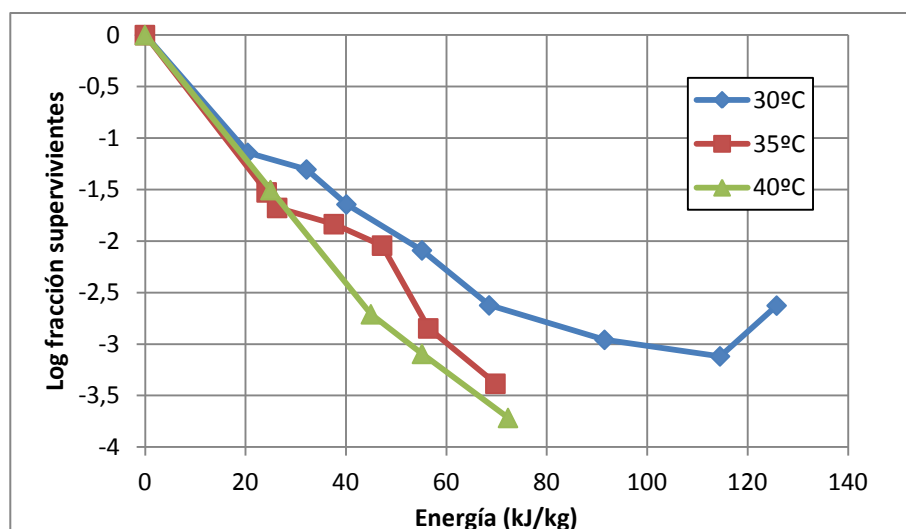


Figura 4.10. Inactivación de *L. monocytogenes* en zumo de naranja mediante un tratamiento PEAV en flujo continuo a diferentes temperaturas sin considerar el efecto térmico.

En base a estos nuevos datos, se puede determinar el efecto de los parámetros temperatura inicial (T_{ini}), energía aplicada (W), el tiempo (t) y temperatura final (T_f) en la muerte (L) por PEAV de *L. monocytogenes* en zumo. Para ello y mediante regresión múltiple, se obtuvieron las siguientes ecuaciones matemáticas que relacionaban estos parámetros (la bondad del ajuste de los modelos anteriores queda reflejada por los índices estadísticos obtenidos):

$$\text{Log}_{10} L = -0,0232 - 0,00168 * T_{ini} * W + 0,000196 * W^2; R^2 = 0,98, \text{ECM} = 0,145 \text{ (Ec. 4.2)}$$

$$\text{Log}_{10} L = -0,0232 - 0,00015 * t^2 - 0,00149 * t * T_{ini}; R^2 = 0,98, \text{ECM} = 0,146 \text{ (Ec. 4.3)}$$

$$\text{Log}_{10} L = 0,194 + 0,0103 * T_{ini}^2 - 0,014 * T_{ini} * T_f + 0,0033 * T_f^2; R^2 = 0,98, \text{ECM} = 0,142 \text{ (Ec. 4.4)}$$

A partir de estas ecuaciones, se pueden obtener gráficas de superficie-respuesta (Figura 4.11ABC) que permiten ver la interacción de los parámetros en la inactivación por PEAV de *L. monocytogenes* en zumo de naranja. Como se observa, para una misma temperatura inicial, la muerte aumenta con la energía PEAV aplicada en mayor medida cuando la temperatura inicial es mayor (Fig. 4.11A). O para un mismo nivel PEAV de energía, la inactivación es mayor cuando la temperatura inicial es mayor. Conclusiones similares se pueden obtener con la gráfica 4.11B donde la inactivación aumenta con el tiempo de tratamiento siendo mayor cuando la temperatura inicial era superior. Finalmente, la muerte fue mayor al alcanzarse las temperaturas finales más elevadas. Este efecto fue ligeramente superior al aumentar la temperatura inicial de los PEAV.

A partir de las ecuaciones desarrolladas, se pueden obtener las condiciones de tratamiento para conseguir un determinado nivel de inactivación de *L. monocytogenes* en zumo de naranja. A modo de ejemplo, se muestra la figura 4.12 en la que se representa la energía específica a aplicar a 21,5 kV/cm y la temperatura inicial del tratamiento para conseguir distintos niveles de inactivación de *L. monocytogenes*. Como se ha indicado en la introducción, para garantizar la seguridad sanitaria de un producto, hay que alcanzar 5 Log₁₀, según la FDA, del microorganismo patógeno de referencia. Según este trabajo, considerándose *L. monocytogenes* el microorganismo objeto de estudio en este zumo de naranja, las condiciones para alcanzar ese objetivo variarían desde los 90 kJ/kg y 40°C de temperatura inicial hasta los 125,8 kJ/kg y 35°C de temperatura inicial aplicando PEAV de 21,5 kV/cm.

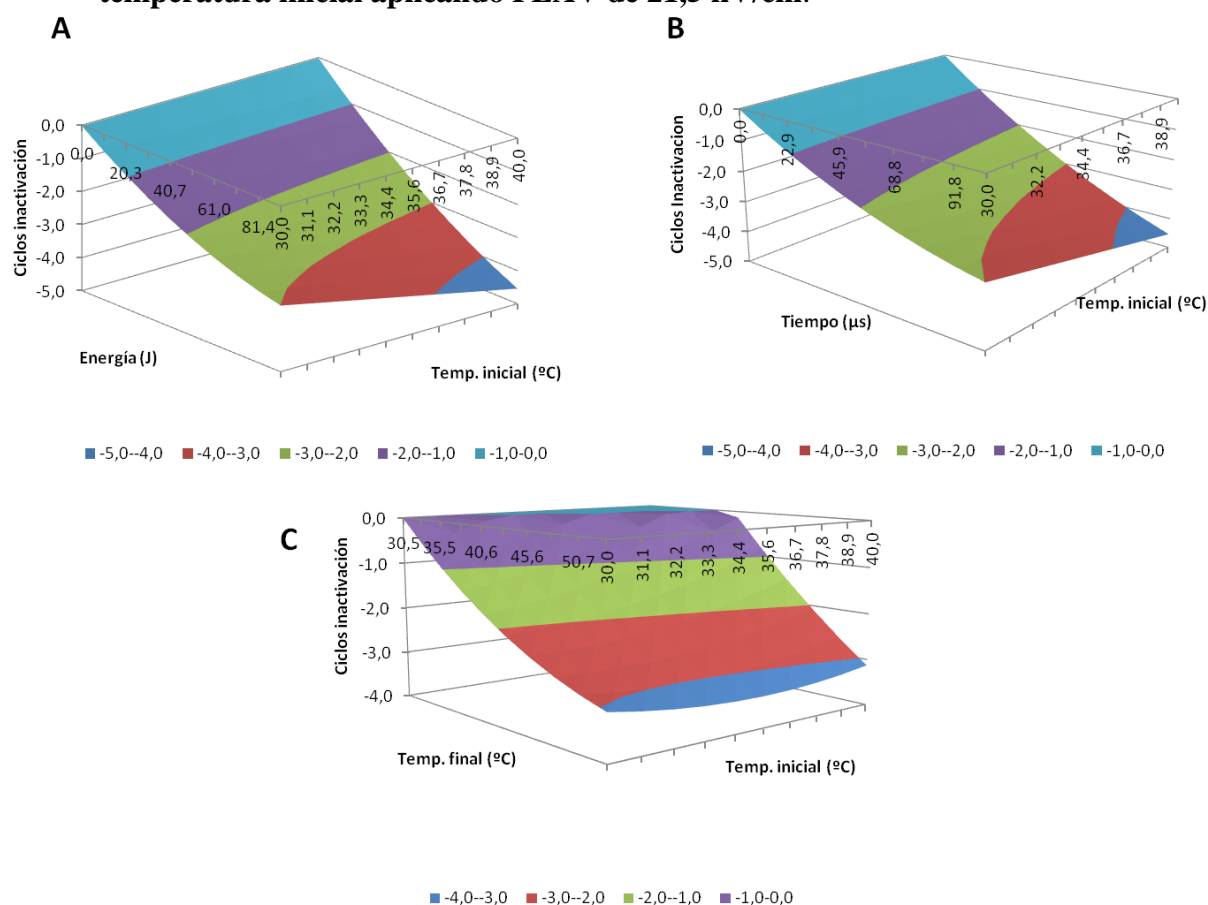


Figura 4.11. Gráficas de superficie-respuesta obtenida a partir de las ecuaciones 4.2, 4.3 y 4.4 que relacionan la inactivación de *L. monocytogenes* únicamente por el tratamiento PEAV (21,5 kV/cm; 78 μs) en continuo a distintas energías, temperaturas iniciales y finales, y tiempo.

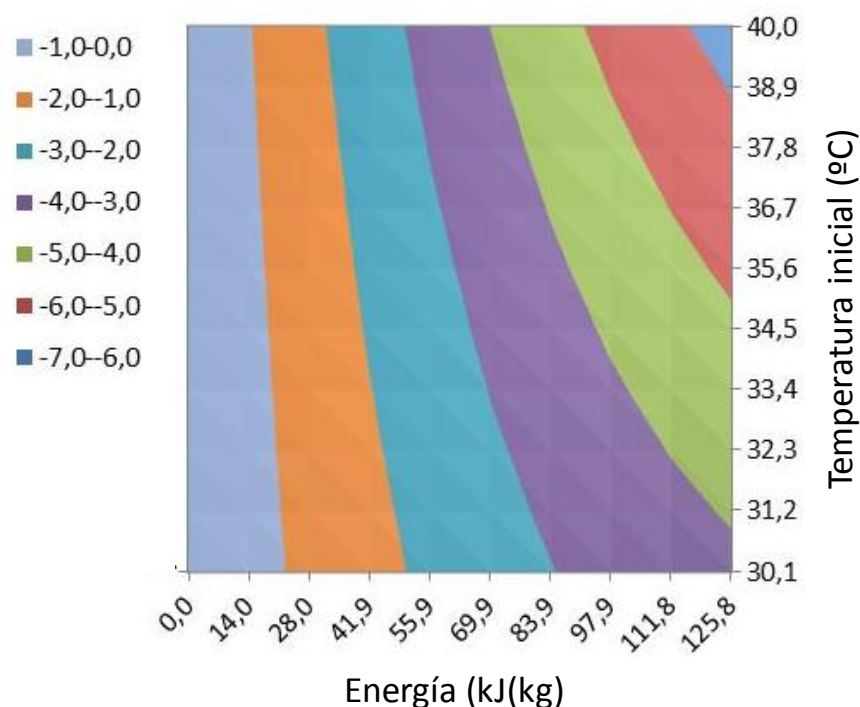


Figura 4.12. Condiciones de contorno para conseguir distintos niveles de inactivación de *L. monocytogenes* mediante PEAV (21,5 kV/cm) en zumo de naranja.

Por tanto, estas serían las condiciones de procesado para asegurar la inocuidad de este zumo de naranja frente a *L. monocytogenes*. Para que estas condiciones pudiesen considerarse de referencia para pasteurizar zumo de naranja, habría que comprobar con otros microorganismos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, etc. la letalidad de estos tratamientos y determinar si también se conseguirían los 5 Log₁₀ recomendados por la FDA. De ser estos los tratamientos recomendados, habría que determinar la vida útil del zumo procesado así como evaluar si realmente la calidad del producto fresco mantenía el aspecto último esperable ya que los tratamientos PEAV aplicados son muy cortos; en esta investigación, de 1,4 segundos.

Si tras esos estudios los tratamientos propuestos siguen siendo los adecuados para la pasteurización del zumo, Sampedro et al. (2013) estimaron aplicando tratamientos similares, el coste total del proceso PEAV que se estimaría en unos 0,03€/L, 1,7 veces superior al del procesado tradicional por el calor estimados para una producción anual de 16500 Tm al año y 5500 h/año de producción. De ese coste, el 54% procedería del equipo, 35% correspondería al propio procesado y el 11% restante al gasto en electricidad.

5. CONCLUSIONES

1. La inactivación de *L. monocytogenes* en zumo de naranja por PEAV dependió de la intensidad del campo eléctrico, del tiempo, energía y temperatura de tratamiento aplicados.
2. La letalidad del proceso incrementó con la temperatura, observándose un efecto sinérgico en la letalidad entre los PEAV y temperaturas subletales.
3. Desde un punto de vista práctico, interesa aumentar la temperatura inicial del tratamiento ya que el coste energético del proceso PEAV es menor para conseguir la misma eficacia letal.
4. Se han desarrollado modelos matemáticos que han permitido describir la muerte de *L. monocytogenes* en zumo de naranja por calor y por PEAV a distintas temperaturas.
5. Se han definido condiciones de procesado basados en los PEAV que podrían reducir varios ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en zumo de naranja con tiempos de tratamiento de 1,4 segundos.

5. CONCLUSIONS

1. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in orange juice by PEAV juice it depended on the intensity of the electric field, the time, energy and temperature of treatment applied.
2. The lethality of the process increased with temperature, with a synergistic effect in lethality between the PEAV and sublethal temperatures.
3. From a practical point of view, are interested in the initial treatment temperature increases since the energy cost of the process PEAV is less to get the same lethal efficiency.
4. Have been developed mathematical models that have allowed to describe the death of *Listeria monocytogenes* in at different temperatures for heat and PEAV orange juice.
5. Processing conditions have been defined based on the PEAV which could reduce several logarithmic cycles of *Listeria monocytogenes* in orange juice with treatment of 1.4 seconds times.

6. APORTACIONES

Con la realización de este proyecto he podido mejorar el desarrollo de algunas competencias transversales, las cuáles considero útiles para mi formación y posterior incorporación al mercado laboral, estas son:

-Capacidad de adaptación a situaciones nuevas. La elaboración de un proyecto como estudiante me ha supuesto el enfrentarme a situaciones como nuevos ambientes de trabajo.

-Capacidad de organización y planificación autónoma del trabajo

-Dominio de aplicaciones informáticas relativas al ámbito de estudio. Para desarrollar los resultados he tenido que utilizar softwares informáticos, es el caso del programa Essential Regression de Excel, del cual había adquirido conocimientos muy básicos durante asignaturas anteriores.

-Capacidad de comunicación correcta oral y escrita en castellano y capacidad de leer en inglés. Parte de la literatura científica consultada para la redacción de este proyecto se encontraba en inglés lo que me ha hecho ampliar mis conocimientos en el idioma.

-Capacidad de aplicación de los conocimientos teóricos a situaciones experimentales. Una de las principales consignas para poder trabajar en el laboratorio es haber adquirido antes los conocimientos teóricos necesarios, los cuales me han sido aportados durante estos años por las asignaturas de esta titulación.

-Capacidad de transmitir información. La elaboración de un informe científico principalmente persigue el objetivo de transmitir información y es por lo que esta competencia queda justificada.

-Adquisición de nuevos conocimientos en un área específica de mi titulación. La Tecnología de los Alimentos es una rama de la titulación que se divide en varios campos, en mi caso, la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje me ha permitido adquirir conocimientos basados en tecnologías para conservar alimentos alternativas a las más tradicionales, como pueden ser el calor, el frío o la deshidratación.

- Capacidad de realización y planificación de una propuesta científica. Junto con mi director de proyecto desarrollé una metodología experimental para llevar a cabo este trabajo en el laboratorio; considerando todos los parámetros necesarios para conseguir los objetivos de este trabajo.

- **Capacidad de interpretación de resultados.** Esta es una de las competencias más trabajadas a lo largo de la titulación, ya que en asignaturas previas he tenido que realizar informes de los resultados obtenidos en prácticas y en prototipos de alimentos (Practicum Planta Piloto).

Con este trabajo he tenido la oportunidad de profundizar en la adquisición de ciertas competencias específicas de los 6 perfiles profesionales de la titulación:

1. Procesado de alimentos:

- Identificar y valorar los problemas asociados a los diferentes alimentos y a su procesado y proponer aquellas medidas necesarias para solventarlos.
- Conocer e interpretar los fundamentos de los procesos de la industria alimentaria, así como los aspectos técnicos más novedosos de cada proceso y/o producto, relacionados con su composición, funcionalidad, procesado, etc.
- Elaborar, transformar, higienizar y conservar alimentos.

3. Seguridad alimentaria:

- Identificar los agentes de peligro que pueden intervenir en cualquiera de las fases de la cadena alimentaria y los sistemas de prevención y control. Analizar, evaluar y gestionar los riesgos sanitarios en la cadena alimentaria.

4. Desarrollo e innovación de procesos y productos en el ámbito alimentario:

- Diseñar y elaborar nuevos procesos y productos para satisfacer necesidades y demandas sociales.
- Conocer los aspectos científicos y técnicos más novedosos de cada producto, relacionados con su composición, valor nutritivo y propiedades saludables, funcionalidad, procesado, seguridad, vida útil, etc.

5. Asesoría legal, científica y técnica en el ámbito alimentario:

- Elaborar y emitir informes científicos y técnicos relacionados con la industria alimentaria.

6. Docencia e investigación en el ámbito alimentario:

- Recopilar y analizar información, elaborar hipótesis, diseñar y llevar a cabo experimentos, interpretar los resultados y elaborar conclusiones.

7. EVALUACIÓN Y SUGERENCIAS DE MEJORA

Esta asignatura, desde mi punto de vista, supone una de las partes más interesantes del plan de estudios ofertado en el Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos ya que permite elegir entre amplia variedad de propuestas el tema que más se ajusta a las preferencias personales de cada alumno, desarrollarlas y poder adquirir nuevos conocimientos en el tema elegido. Esto supone un aliciente para elaborar un buen proyecto.

Además de lo anterior, creo de gran importancia desarrollar habilidades orientadas a un campo más profesional, que no se pueden conseguir únicamente en las aulas (manejo de equipos e instrumental, libertad de movimiento en el laboratorio y responsabilidad en la toma de decisiones entre ellas).

La asignatura se cursa en el último cuatrimestre de la titulación, lo que es lógico ya que se tienen que poner en marcha los conocimientos adquiridos hasta entonces, y junto a ella se presenta otra de las asignaturas más complejas de la titulación “Practicum Planta Piloto”, ya que requiere una elevada inversión de horas. Siendo prácticamente la primera vez que se trabaja de forma autónoma en un laboratorio, el riesgo de que surjan problemas en los ensayos es mayor, lo que requiere una garantía temporal suficiente que en ocasiones limita la presentación del Trabajo Fin de Grado en la primera convocatoria.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, I; Pagán, R; Condón, S; and Raso, J. 2003. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulses electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 87-95.
- Buckow, Roman; Ng, Sieh; Toepfl, Stefan; German Institute of Food Technologies. 2013. Pulses electric field processing of citrus juices. *Journal of Food Science*.
- Cebrián, G. 2009. Mecanismos de inactivación y Resistencia de *Staphylococcus aureus* a diferentes procesos de conservación de los alimentos. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Condón, S. 2013. Resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje, aplicados a diferentes temperaturas, de microorganismos patógenos en medios de diferente pH. Trabajo Fin de Máster, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

- Farber, J. M. and 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.
- Gandhi, M., and Chikindas, M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.*, 113(1), 1-15.
- Monfort, S. 2012. *Pasteurización de huevo líquido por pulsos eléctricos de alto voltaje* Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Odriozola, I. 2009. *Obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial antioxidante mediante tratamientos no térmicos*. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de Lleida.
- Puértolas, E. 2010. *Aplicación de los pulsos eléctricos de alto voltaje al proceso de vinificación*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Raso, J., Heinz, V. 2006. Pulsed electric fields technology for the food industry. *Food Engineering Series*. 99-124, 199.
- Sagarzazu, N. 2010. *Estudio del desarrollo de respuestas de adaptación al estrés en microorganismos de interés en los alimentos*.
- Saldaña, G. 2011. *Criterios para la pasteurización de alimentos por pulsos eléctricos de alto voltaje*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Saldaña, G; Álvarez, I; Condón, S; and Raso, J. 2013. Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI:10.1080/10408398.2011.638995.
- Sampedro, F; McAloon, A; Yee, W; Fan, X; Zhang, H.Q.; Geveke, D.J. 2013. Cost analysis of commercial pasteurization of orange juice by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.72-78.
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., and Tauxe, R. V., 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J. Food Prot.* 71(2), 356-364.
- Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG, 1995, Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization, *Journal of Food Engineering* 25, 261-281.
- Zwietering, M.H., Jongen Burger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1875-1881.