

2013/2014

# INACTIVACIÓN MICROBIANA POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

JORGE TREMÍN PUYOD

# Índice

<u>Resumen</u> .....	1
<u>Resumen en inglés</u> .....	2
1. <u>Introducción</u> .....	4
1.1. <u>Mecanismo de acción de los PEAV</u> .....	5
1.2. <u>Factores que afectan a la inactivación microbiana en los PEAV</u> .....	6
1.2.1. <u>Parámetros de procesado</u> .....	6
1.2.2. <u>Características del medio de tratamiento</u> .....	10
2. <u>Justificación y objetivos</u> .....	12
3. <u>Materiales y métodos</u> .....	12
3.1. <u>Medios y reactivos</u> .....	12
3.2. <u>Microorganismos</u> .....	13
3.2.1. <u>Obtención de la suspensión</u> .....	13
3.2.2. <u>Curva de crecimiento</u> .....	13
3.3. <u>Determinación de la concentración máxima no inhibitoria</u> .....	14
3.4. <u>Tratamiento de PEAV</u> .....	15
3.4.1. <u>Generador de pulsos eléctricos</u> .....	15
3.4.2. <u>Cámara de tratamiento</u> .....	15
3.4.3. <u>Metodología para la aplicación de los tratamientos PEAV a diferente temperatura</u> .....	16
3.5. <u>Incubación y recuento de supervivientes</u> .....	17
3.5.1. <u>Recuento de supervivientes</u> .....	17
3.6. <u>Análisis de resultados</u> .....	17
4. <u>Resultados y discusión</u> .....	18
4.1. <u>Inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 por PEAV con pulsos de microsegundos</u> .....	19
4.1.1. <u>Generación de daño subletal debido a la aplicación de tratamientos PEAV</u> .....	24
4.2. <u>Inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 por PEAV con pulsos de milisegundos</u> .....	27
4.2.1. <u>Generación de daño subletal debido a la aplicación de tratamientos PEAV</u> .....	30
4.3. <u>Comparación de los modelos de microsegundos y milisegundos en la eficacia letal de los tratamientos</u> .....	32
5. <u>Conclusiones</u> .....	38
5.1. <u>Conclusiones en inglés</u> .....	39
6. <u>Aportaciones al aprendizaje</u> .....	39
7. <u>Bibliografía</u> .....	41
 <u>ANEXO I</u> .....	43
 <u>ANEXO II</u> .....	45

## **Resumen**

En este trabajo se ha investigado por primera vez el efecto de la anchura del pulso en el rango de mili y microsegundos en la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 en un tampón de pH 3,5 al aplicar tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) a distintas temperaturas (desde los 20 hasta los 40°C). Ello ha requerido la utilización de dos equipos distintos aplicando pulsos de mili y microsegundos de distintas intensidades del campo eléctrico (de 4 a 10 kV/cm en el caso de los milisegundos y de 15 a 25 kV/cm para los microsegundos) y energía específica.

Los resultados han mostrado que la inactivación incrementó con la intensidad del campo eléctrico, la temperatura y la energía aplicada tanto cuando se aplicaron pulsos de mili y microsegundos. De los tres factores investigados, la temperatura fue la que más influyó sobre todo cuando se aplicaron pulsos de milisegundos, estando condicionado dicho efecto con la intensidad y la energía aplicadas. Cuando se compararon tratamientos de la misma energía específica aplicada, los tratamientos de microsegundos fueron más eficaces letalmente que los milisegundos a temperaturas inferiores a los 27°C, mientras que a temperaturas superiores, los milisegundos produjeron un mayor nivel de inactivación. Estos resultados suponen una novedad ya que hasta la fecha se había comprobado, pero únicamente a temperatura ambiente, que era preferible aplicar tratamientos cortos y de alta intensidad del campo para producir una mayor inactivación microbiana. La posibilidad de aplicar tratamientos PEAV a temperaturas controladas y constantes ha permitido observar este efecto. En cualquier caso y para confirmar estos resultados, se hace necesario determinar si la muerte microbiana observada se debe al efecto de los tratamientos PEAV y no a un efecto combinado de los PEAV con especies químicas que se podría haber producido como consecuencia del uso de pulsos de anchura superior a 20 microsegundos como se ha indicado en la literatura.

### **Resumen en inglés**

The present work studies the electric pulse width in the *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in a mili and microseconds grade for the first time, applying treatments in a pH 3.5 tampon media with high voltage pulsed electric fields (HVEP) with temperature variations (20°C to 40°C). It has been required the use of two different equipment to apply different electric field intensities (4 to 10 kV/cm in the case of milliseconds and 15 to 25 kV/cm in the case of microseconds) and specific energies.

The results have shown that the inactivation was higher with the intensity of the electric field, the temperature and the applied energy in the case of milliseconds and microseconds. The temperature was the most influent factor, especially with milliseconds, and was influenced by the intensity and energy applied. When the treatments with the same specific energy were compared, the microsecond treatments were more lethally efficient than millisecond treatments in temperatures lower than 27°C. On the other hand, when the temperature was over 27°C the millisecond treatments were more effective than the microsecond ones. These results have a substantial difference compared to the data collected in the literature. These data show that, under an ambient temperature, the short treatments with a high intensity were more efficient in order to achieve a high microbial inactivation. That has been possible due to the possibility to apply HVEP under controlled and constant temperatures. Despite of that it is necessary to investigate if the microbial death is due to the HVEP effect and it isn't to the combined actions of HVEP and chemicals species liberated when pulses with a width higher than 20 microseconds were used.

## **1. Introducción**

Actualmente existe una demanda cada vez más fuerte por parte de los consumidores exigiendo alimentos seguros y con un perfil organoléptico óptimo que se asemeje al del producto fresco. Es por esto que a lo largo de las últimas décadas se ha apostado por la investigación de los tratamientos de conservación no térmicos (altas presiones hidrostáticas, radiaciones ionizantes, etc...), destacando los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) como tratamiento para productos líquidos sensibles al calor como los zumos de frutas principalmente (A. Rivas et al., 2005; E. Puértolas et al., 2010).

El tratamiento por PEAV es un método de conservación capaz de inactivar células vegetativas de microorganismos, pero no esporos de ahí que su aplicación se centre en la pasteurización de alimentos líquidos ácidos (José Á. Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010). Este método consiste en situar el producto a tratar en una cámara provista de dos electrodos a los que se les aplica pulsos de alto voltaje durante períodos de tiempo del orden de microsegundos o milisegundos. De esta forma se induce un campo eléctrico de alta intensidad en el alimento que se encuentra entre los electrodos (Barbosa-Cánovas y Sepúlveda, 2005).

Es este campo el que produce un fenómeno denominado electroporación en la membrana citoplasmática de células procariotas y eucariotas (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). Esta formación de poros de la membrana celular puede ser temporal o permanente, dependiendo de la intensidad del campo eléctrico suministrado, permitiendo aplicar esta tecnología a la consecución de diferentes objetivos. La electroporación temporal se utiliza, por ejemplo, en la biotecnología con el objetivo de introducir pequeñas moléculas como oligonucleótidos o plásmidos en el interior de las células. A lo largo de los últimos años se ha utilizado esta tecnología en la medicina clínica para avanzar en el tratamiento de distintos tipos de cáncer facilitando la entrada de los medicamentos en las células tumorales (Shutao Wang *et al.*, 2012).

Por el contrario, la formación de poros permanentes se utiliza para mejorar la transferencia de masa del interior al exterior de la célula y así extraer componentes intracelulares de interés cuando se aplica sobre células eucariotas (Henry Jaeger *et al.*, 2011; B.I.O. Ade-Omowaye *et al.*, 2001; Vorobiev & Lebovka, 2008).

La electroporación permanente de la membrana citoplasmática de células procariotas produce la inactivación de la célula a temperaturas inferiores que los métodos tradicionales térmicos de conservación (Claudia Siemer *et al.*, 2014; Gianpiero

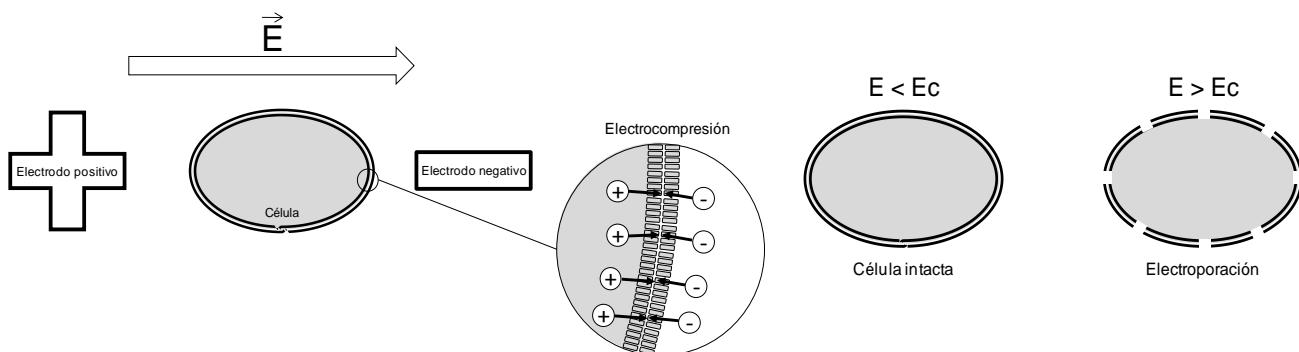
Pataro *et al.*, 2014; M.B. Fox *et al.*, 2008), permitiendo la obtención de alimentos inocuos y seguros obviando la degradación organoléptica que producen los tratamientos de conservación por calor. Actualmente, en el campo de los PEAV, se da por hecho que los pulsos aplicados con una intensidad menor ( $10 \text{ kV/cm}$ ) y durante un periodo de tiempo mayor (milisegundos) tienen una eficacia letal y una eficiencia energética mucho menor que los pulsos que se aplican con una intensidad mayor ( $20\text{-}30 \text{ kV/cm}$ ) y un corto periodo de tiempo (microsegundos). A pesar de que estas afirmaciones se dan como válidas no existen datos directamente comparables que las respalden, convirtiendo esto en una teoría que necesita de respaldo experimental (Saulis *et al.*, 2012).

### **1.1 Mecanismo de acción de los PEAV**

La letalidad derivada de la aplicación de pulsos eléctricos así como la mejora de la extracción de compuestos del interior de células es consecuencia de un fenómeno denominado electroporación. Este mecanismo consiste en la aparición de poros en la membrana citoplasmática de las células permitiendo la salida de compuestos citoplasmáticos al exterior de la misma.

Esto se puede explicar mediante la teoría electromecánica que dicta que cuando se expone la célula a un campo eléctrico se produce un cúmulo de iones con cargas opuestas a cada lado de la membrana citoplasmática. Esto produce un aumento del potencial transmembrana que, si el campo eléctrico suministrado es suficientemente intenso, aumentará hasta valores cercanos a 1 V lo que producirá la formación de poros en la membrana (Teissié *et al.*, 2002).

Cundo se produce este efecto se dice que se está aplicando un campo eléctrico crítico por lo que los poros serán irreversibles. En el caso de que el campo eléctrico suministrado no permita alcanzar un potencial transmembrana de 1 V los poros formados serán reversibles.



**Figura 1.1.** Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV.  $E$  es el campo eléctrico aplicado y  $Ec$  es el campo eléctrico crítico. (Extraído de Saldaña 2011).

## **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. A continuación, se comentarán aquellos factores de interés en este trabajo.

<b>Tabla 1. Factores que afectan a la inactivación microbiana por PEAV</b>		
<b>Parámetros de procesado</b>	<b>Características microbianas</b>	<b>Parámetros del producto</b>
Intensidad del campo eléctrico	Condiciones de crecimiento	Composición
Duración del pulso	- Composición del medio	Conductividad
Número de pulsos	- Temperatura	Fuerza iónica
Temperatura inicial	- Concentración de oxígeno	pH
Temperatura final	Fase de crecimiento	$A_w$
Forma del pulso	- Tiempo de incubación	
Configuración de la cámara	Condiciones de recuperación	
- Volumen	- Composición del medio	
- Gap	- Temperatura	
- Flujo <sup>a</sup>	- Tiempo de recuperación	
- Frecuencia	- Concentración de oxígeno	
- Energía específica		
- Tiempo de permanencia <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> Para tratamientos continuos

(Extraído de Wouters *et al.*, 2001)

### **1.2.1 Parámetros de procesado**

Son numerosos los parámetros inherentes al procesado que afectan a la inactivación microbiana por la aplicación de pulsos eléctricos. Entre ellos podemos destacar por su importancia la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento (Álvarez *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009), la energía específica (Heinz *et al.*, 2001), la forma, la anchura y la frecuencia de los pulsos eléctricos y la temperatura del medio.

#### **- Intensidad del campo eléctrico suministrado**

La intensidad del campo eléctrico ( $E$ ) se puede definir como la diferencia de potencial aplicada entre dos electrodos ( $v$ ) donde se coloca el alimento por unidad de longitud ( $d$ ), y suele expresarse en kV/cm:

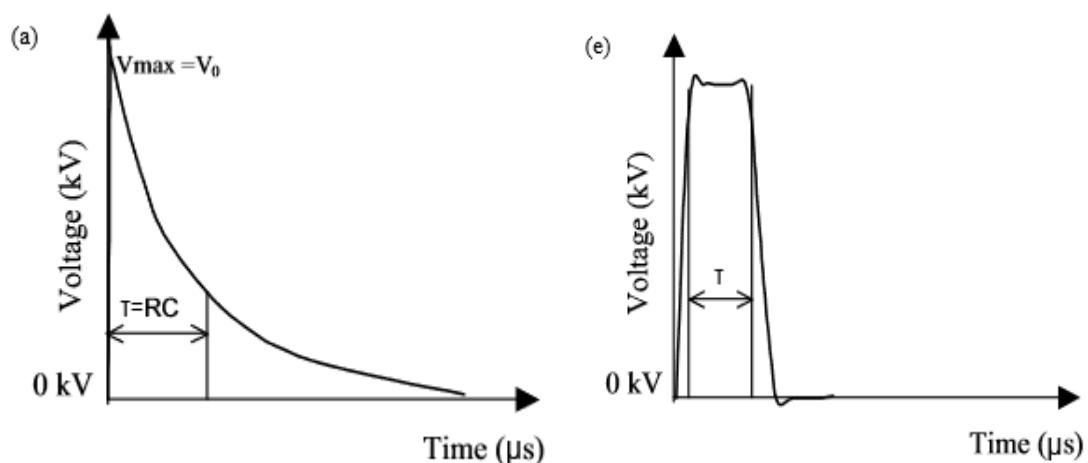
$$(Ec. 1.1) \quad E = \frac{V}{d}$$

Como hemos descrito anteriormente la intensidad del campo eléctrico aplicado debe ser superior al campo eléctrico crítico para que se formen poros irreversibles y, por lo tanto, se produzca efecto letal en el microorganismo. Se ha observado que suministrando campos eléctricos de 5 kV/cm se producía letalidad con ciertos microorganismos y bajo condiciones concretas de tratamiento, pero los campos que se suelen utilizar oscilan entre los 10 y los 30 kV/cm.

- **Forma del pulso**

Existen dos tipos de pulsos que difieren entre sí en la forma de los mismos (figura 1.2). Por un lado existen los pulsos de caída exponencial en los que comienzan a intensidad elevada pero esta va decreciendo a lo largo de la anchura del pulso, y por otro lado, los pulsos de onda cuadrada aplican la intensidad máxima del campo eléctrico a lo largo de toda la anchura del pulso (Góngora-Nieto *et al.*, 2002).

Actualmente los pulsos más utilizados son los pulsos de onda cuadrada, debido a que la energía liberada se aplica a intensidades de campo más o menos homogéneas durante toda la duración del pulso, produciendo efecto letal en su totalidad y, permitiendo controlar el tiempo y el voltaje aplicado. En estos pulsos, el tiempo en el que se aplica más o menos constante el voltaje es lo que se define como anchura del pulso. Esto difiere de los pulsos de caída exponencial en los que parte de esta energía se aplica a intensidades demasiado bajas como para que se produzca letalidad y, por lo tanto, solo contribuye al calentamiento del producto. (Wouters *et al.*, 1999)



**Figura 1.2.** Representación de pulso de onda cuadrada (e) y de pulso de caída exponencial (a) (Extraído de Góngora-Nieto *et al.*, 2002).

- **Tiempo de tratamiento**

El tiempo de tratamiento ( $t$ ) se define como el tiempo total efectivo durante el cual se aplica el campo eléctrico y se calcula multiplicando el número de pulsos ( $n$ ) suministrados por la anchura del pulso ( $\tau$ ):

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

Si bien en la actualidad se suelen aplicar pulsos del orden de microsegundos en los que se aplican intensidades de campo elevadas (20-30 kV/cm) con el fin de inactivar microorganismos, el efecto de la anchura del pulso en la letalidad de estos tratamientos no está totalmente aclarada. Algunos autores han observado que el efecto letal de un tratamiento no depende de la anchura del pulso aplicado (Hülsheger y col., 1981; Raso y col., 2000; Álvarez y col., 2003). Por el contrario, Aronsson y col. (2001) observaron una mayor inactivación de diferentes microorganismos cuando aplicaban la misma intensidad de campo y tiempo de tratamiento con pulsos más anchos. Wouters y col. (1999) determinaron que el efecto de la anchura del pulso dependía de la intensidad de campo eléctrico. Así, mientras que a 36 kV/cm la anchura del pulso no influía sobre la inactivación de *Listeria innocua*, a 28 kV/cm observaron una mayor inactivación cuando aplicaron pulsos más anchos. Los resultados obtenidos por Aronsson y col. (2001) y Wouters y col. (1999) fueron obtenidos con tratamientos en los que la temperatura final de la muestra superaba los 40° C, siendo mayor la temperatura final cuanto más ancho era el pulso aplicado. Estas temperaturas, como más adelante se indica, pueden potenciar el efecto letal de los pulsos eléctricos e influir en el efecto de la anchura del pulso sobre la inactivación microbiana. Martín-Belloso y col. (1997ab) obtuvieron mayores niveles de inactivación de *E. coli* en huevo líquido y leche desnatada cuando, a una misma intensidad de campo y sin superar los 37° C, aplicaban pulsos más anchos.

Por otra parte, se ha observado que para un consumo energético constante, pulsos cortos y de alta intensidad son más efectivos que los pulsos de mayor anchura y menor intensidad del campo (Schoenbach y col., 1997; Heinz y col., 1999; Vernhes y col., 2002). Los pulsos de menor anchura presentan además otras ventajas adicionales ya que evitan el calentamiento excesivo de la muestra y reducen el posible paso de material del electrodo al medio de tratamiento o la posible formación de compuestos químicos (Sale y Hamilton, 1967; Sale y Hamilton, 1968; Mizuno y Hori, 1988; Lubicki y Jayaram, 1997). Ho y Mittal (2000) observaron que en sus condiciones de trabajo, pulsos de más de 20  $\mu$ s de anchura podrían dar lugar a fenómenos de electrolisis. Como

consecuencia de los mismos, se podrían generar especies químicas letales para los microorganismos.

Si bien son diversas las investigaciones sobre el efecto de la anchura del pulso en la inactivación microbiana, no existen datos en los que se haya hecho una comparación directa en la eficacia letal de tratamientos del mismo nivel energético, pero distinta intensidad del campo eléctrico, anchura de pulso y número de pulsos en condiciones en las que se haya controlado la temperatura del medio.

- **Frecuencia**

La frecuencia se define como el número de pulsos que se aplican por unidad de tiempo y se expresa en hertzios (Hz). La frecuencia utilizada en los tratamientos PEAV depende, entre otros factores, de si el tratamiento a aplicar es en continuo o en estático. En tratamiento de naturaleza continua se pueden aplicar mayores frecuencias debido a que el aumento de temperatura de la muestra es menor y se puede controlar de manera más efectiva. En cambio en los tratamientos realizados de forma estática una elevada frecuencia de suministro de pulsos podría producir un aumento de la temperatura elevado de la cámara pudiendo generar rupturas dieléctricas. Es por esto que en estático, tipo de tratamiento utilizado en este trabajo, se suelen utilizar frecuencias entre 0,5 y 5 Hz (Raso *et al.*, 2000).

- **Energía del pulso**

La energía eléctrica de un pulso ( $W$ ), aplicada sobre un producto, durante un tratamiento de PEAV es una de las principales herramientas para conocer el coste energético del proceso y, por lo tanto, se define como un buen comparador entre diferentes tipos de tratamiento. Para calcularla se tiene en cuenta la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos a lo largo del tratamiento ( $V$ ), la intensidad de corriente en amperios ( $I$ ) y la duración del pulso ( $t$ ):

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

Para hacer uso de este parámetro como herramienta para conocer el coste energético del proceso se suele utilizar la energía específica ( $W'$ ) que nos muestra la energía utilizada por unidad de masa de producto procesado ( $m$ ) contabilizando el número de pulsos suministrado:

$$(Ec. 1.5) \quad W' = \frac{W \times n}{m}$$

- **Temperatura**

La temperatura es un parámetro importante a controlar durante los tratamientos con pulsos eléctricos. Esto se debe a que durante el mismo la energía suministrada al alimento que no causa letalidad en microorganismos produce incrementos de temperatura del alimento a tratar.

Así la temperatura a la que se encuentra el alimento en el momento de ser tratado influye en la letalidad del tratamiento suministrado aunque las temperaturas no alcancen valores letales para los microorganismos. Esto es debido a que los incrementos de temperatura producen una modificación en la fluididad de los fosfolípidos que favorece la electroporación de la membrana aumentando, por lo tanto, la efectividad del tratamiento suministrado (Heinz *et al.*, 2003; Fleischman *et al.*, 2004; Saldaña, 2010).

Con el objetivo de prevenir los incrementos de temperatura para evitar fluctuaciones en los parámetros de procesado y, además, para aprovechar el efecto sinérgico presente entre la electroporación de la membrana de microorganismos y la aplicación de temperaturas no letales el grupo de investigación de “Nuevas Tecnologías de Procesado de Alimentos” de la Universidad de Zaragoza ha diseñado una cámara estática de electrodos paralelos que permite la aplicación de los tratamientos con PEAV manteniendo constante la temperatura de la muestra mediante la termoestatación de los electrodos de la cámara (Saldaña *et al.*, 2010).

#### **1.2.2. Características del medio de tratamiento**

Uno los principales factores que condicionan la resistencia microbiana a los PEAV es el pH del medio de tratamiento, observándose efectos distintos. Así, 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, se ha observado que 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 (Garcia *et al.*, 2005; Somolinos *et al.*, 2008).

## **2. Justificación y objetivos**

Actualmente, se han ido desarrollando en el ámbito de la industria alimentaria una serie de nuevas técnicas de conservación de los alimentos. Estas nuevas técnicas se sustentan en la cada vez más creciente preocupación por parte de los consumidores en la existencia de alimentos con características organolépticas similares a los productos frescos y, además, sanitariamente seguros. Los tratamientos clásicos cumplen el segundo objetivo, el de producir alimentos seguros, pero la energía térmica aplicada para su consecución suele producir mermas organolépticas importantes que alejan a los alimentos procesados de esa idealidad de frescura.

Los PEAV se sitúan como una de las principales técnicas de pasteurización alternativas a los tratamientos clásicos que se aplican, sobre todo, a los alimentos líquidos, siendo los zumos los mayores beneficiarios. Debido a esto existen numerosos estudios que se centran evaluar la letalidad de esta técnica frente a diferentes especies patógenas y no patógenas, así como en diferentes alimentos. En el caso de la destrucción de microorganismos con el objetivo de pasteurizar alimentos líquidos se aplican pulsos de microsegundos a intensidades superiores a los 10 kV/cm ya que se ha observado que pulsos de menor intensidad y mayor duración (milisegundos) tienen poca eficacia letal, una menor eficiencia energética y una posible mayor posibilidad de producirse fenómenos de electrolisis que dañan los electrodos y pueden generar especies químicas letales para los microorganismos así como afectar a la calidad de los alimentos.

Si bien son diversas las investigaciones sobre el efecto de la anchura del pulso en la inactivación microbiana, no existen datos directamente comparables realizados en condiciones experimentales similares sobre un mismo microorganismo que permitan evaluar el efecto de este parámetro en la inactivación microbiana, considerando los principales parámetros de procesado de la tecnología: intensidad del campo eléctrico, tiempo, energía específica y temperatura de tratamiento.

Es por ello que el **objetivo principal** de esta investigación ha sido la evaluación de la eficacia letal de tratamientos con pulsos eléctricos de alto voltaje de una anchura de pulso del orden de microsegundos frente a tratamientos aplicados con pulsos de milisegundos a distintas temperaturas de tratamiento. Como medio de tratamiento, se ha utilizado un tampón 3,5 y como microorganismo de referencia *Escherichia. coli O157H7*, elegida por su elevada resistencia a los PEAV en medio ácido.

Para llevarlo a cabo este objetivo ha sido necesario la consecución de los siguientes **objetivos parciales**:

- Estudio de las características del microorganismo (*E. coli O157H7*) como las fases de crecimiento y tolerancia de crecimiento en medio con sal.
- Estudiar los principales parámetros de los que dependen los tratamientos con PEAV en la letalidad del *E. coli O157H7*, en tampón de pH 3,5, tanto con la aplicación de microsegundos y milisegundos.
- Describir mediante el uso de modelos matemáticos la influencia de los parámetros estudiados anteriormente de tal forma que podamos comparar los resultados de ambos tratamientos.

### **3. Materiales 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. El medio selectivo de recuperación se preparó adicionando cloruro sódico (NaCl) (Panreac, Barcelona, España) a la concentración máxima no inhibitoria al medio de recuento en placa.

Para la preparación del medio utilizado en el tratamiento se utilizó tampón McIlvaine citrato-fosfato. Se preparará mezclando las proporciones adecuadas de soluciones acuosas de fosfato disódico anhidro (Panreac) y ácido cítrico anhidro (Panreac), según describen Dawson *et al.* (1974). El pH del tampón se ajustó a 3,5, que se corresponde con el pH aproximado en el que se enmarcan la mayoría de zumos de cítricos y al que esta bacteria posee una mayor resistencia térmica. Las medidas de pH se llevaron a cabo con un pH-metro con compensación automática de temperatura (modelo basic 20<sup>+</sup>, Crison Instrumental, Barcelona, España). El tampón se diluyó con agua destilada hasta conseguir una conductividad eléctrica de  $1\pm0,01$  mS/cm. Las medidas de conductividad se realizaron con un conductivímetro (mod. 524, Crison Instrumental, Barcelona, España) a temperatura ambiente.

Todos los medios, una vez preparados, se esterilizaron 20 minutos a 121°C en autoclave (Darlab K-400, Terrassa, Barcelona), y se almacenaron a  $4\pm2^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **3.2 Microorganismos**

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* O157H7 aislada por el Dr. Chapman (Chapman et al., 1993). 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. (Anexo II) En esta figura también se indican los diferentes medios, temperaturas y tiempos de cultivo utilizados para el microorganismo.

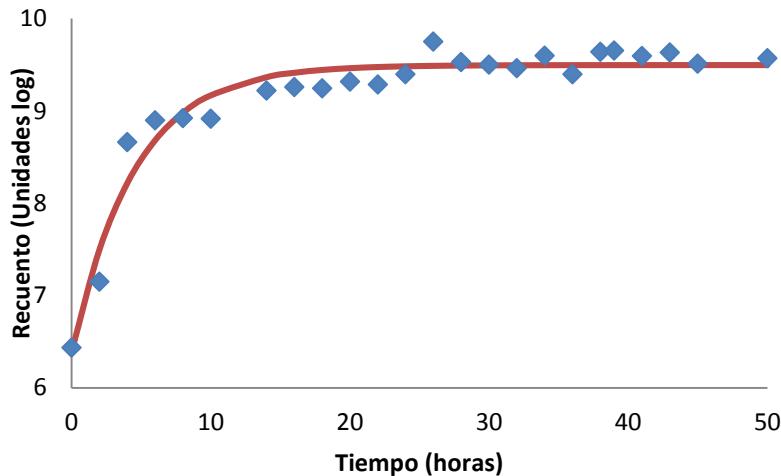
Para la preparación de la suspensión, se partió del correspondiente criovial que se almacenó a -80°C. La cepa congelada se revitalizó en primer lugar en TSB+YE y, a continuación, se sembró en placas de TSA+YE por agotamiento en estría que se incubaron durante 24 h a 37°C y, posteriormente, se almacenaron en nevera (4±2°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, Nikkon, 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  $10^8$  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.

#### **3.2.2 Curva de crecimiento**

La curva de crecimiento (figura 3.2) 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:

$$\log_{10} N_T = -24,63 + 34,13 e^{\{-e^{[-0,22(t+10,28)]}\}}$$

Siendo  $N_T$  el recuento de colonias en el tiempo  $t$ .



**Figura 3.2** Curva de crecimiento de *E. coli* O157:H7 descrita mediante el modelo de crecimiento de Gompertz. (Los puntos corresponden a los [datos experimentales](#) y la [línea](#) al ajuste con el modelo Gompertz)

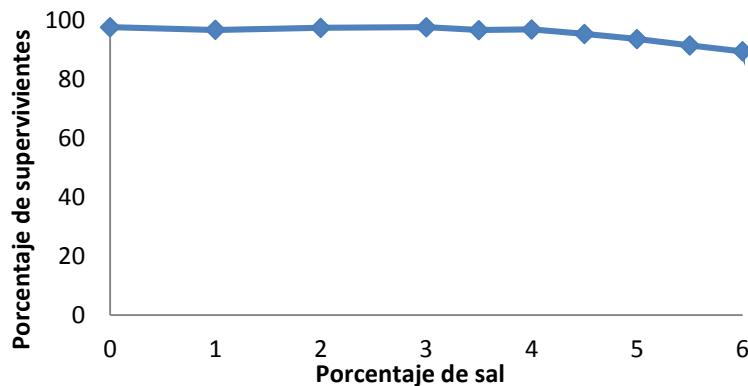
Esta ecuación nos permite saber la población existente en el cultivo en cualquier momento de tal forma que podamos escoger un estado de crecimiento concreto para administrar el tratamiento de pulsos, debido a que este es uno de los parámetros que afectan a la eficacia del mismo. Estudios anteriores revelan que las bacterias de *E. coli* O157H7 son más sensibles a los pulsos eléctricos en fase de crecimiento. Por otro lado la máxima resistencia a los pulsos se desarrolla en la fase estacionaria del microorganismo, siendo para *E. coli* O157H7 máxima y constante a partir de las 18 horas de crecimiento (Condón, 2013). Teniendo esto presente, los cultivos utilizados para los experimentos, se obtuvieron a las 24 horas de incubación.

### 3.3 Determinación de la concentración máxima no inhibitoria

Este estudio se realizó con el objetivo de averiguar la concentración máxima de sal que se debe añadir al medio (selectivo) para que se produzca inhibición de crecimiento. De esta forma se determina, el porcentaje de células dañadas por el tratamiento PEAV aplicado mediante la recuperación de los microorganismos en medio selectivo y no selecto. La diferencia en el recuento en ambos medios indica el número de células dañadas tras los tratamientos.

Para ello, se adicionaron diferentes concentraciones de cloruro sódico (NaCl) (Panreac, Barcelona, España) al medio de TSA+YE. El inóculo se añadió a placas de Petri estériles para realizar la siembra por homogeneización en masa. Éstas se incubaron

durante 48 horas a 37°C obteniéndose la curva correspondiente (figura 3.3). Según los datos obtenidos consideramos que la concentración de *E. coli* empieza a disminuir a partir de una concentración de cloruro sódico de un 4% (figura 3.3).



**Figura 3.3.** Curva de inhibición de crecimiento de *E. coli* O157H7 por presencia de sal en el medio de cultivo.

### 3.4 Tratamiento de PEAV

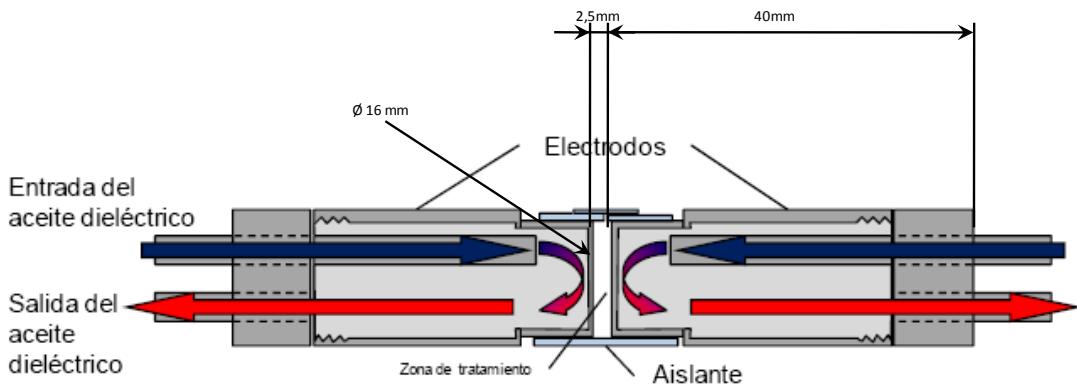
#### 3.4.1 Generador de pulsos eléctricos

El estudio se realizó con dos generadores de pulsos eléctricos, uno preparado para suministrar tratamientos en microsegundos y otro en milisegundos. El correspondiente a los tratamientos en microsegundos fue suministrado por la empresa Scandinova (modulator PG, Scandinova, Uppsala, Suecia) y se describe con detalle en el Anexo I. El equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de  $3\mu\text{s}$  de duración, de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 200 Hz.

En el caso de los tratamientos con milisegundos, se utilizó un equipo (Coustest y col., 2013) que aplica pulsos cuadrados de 1ms y campos de 4 a 10 kV/cm (2.6 a 16 kJ/kg/pulso) a una frecuencia de 0.2 Hz. Su esquema eléctrico y descripción se detalla en el Anexo I.

#### 3.4.2. Cámara de tratamiento

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.



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

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 (figura 3.6) que se termostata haciendo pasar el aceite por un intercambiador de calor.

### 3.4.3. Metodología para la aplicación de los tratamientos de PEAV a diferentes temperaturas.

Para la aplicación de los tratamientos de PEAV a distintas temperaturas, 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión microbiana se añadían a 990  $\mu\text{l}$  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. Para este estudio, se aplicaron campos eléctricos que variaban desde los 15 hasta los 25 kV/cm, aplicando entre 10 y 100 pulsos de 3  $\mu\text{s}$  de anchura de pulso a una frecuencia de 0,5 Hz. El medio de tratamiento fue tampón McIlvaine de pH 3,5 de 1 mS/cm de conductividad eléctrica y termostatado a 20, 30 y 40°C. (figura 3.7 en Anexo II)

### 3.5. 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+YE. Las muestras se recogieron por duplicado para realizar una segunda siembra en medio TSA+YE con el porcentaje de sal obtenido en los experimentos de concentración máxima no inhibitoria. Tras la siembra, las placas se incubaron a  $36\pm1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas las TSA+YE y 48 horas las de TSA+YE y sal. Tiempos más largos de incubación no afectaban al número de microorganismos recuperados tras el tratamiento.



Figura 3.8. Contador automático de colonias

#### 3.5.1. Recuento de supervivientes

El recuento de los microorganismos se efectuó mediante un contador automático de colonias (mod. Protos, *Analytical Measuring Systems*, Cambridge, Reino Unido) (figura 3.8), adaptado para el contaje de placas densamente pobladas en anteriores investigaciones (Condón *et al.*, 1996).

### 3.6 Análisis estadísticos de los resultados

La letalidad de los tratamientos aplicados (PEAV) 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.

Para investigar la influencia de la temperatura (T), el campo eléctrico (E), y la energía aplicada, así como sus posibles interacciones, en la inactivación por PEAV de *E. coli* O157:H7 se utilizó un diseño experimental de composición central y los resultados fueron analizados mediante regresión múltiple aplicando el método de superficie de respuesta. Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

La función de respuesta de las variables ensayadas se estableció en base a componentes lineales, cuadráticos y sus interacciones según la siguiente expresión:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde  $Y$  es la variable de respuesta;  $X_i$  y  $X_j$  son factores independientes;  $\beta_0$  es la ordenada en el origen;  $\beta_i$  son los coeficientes de las relaciones lineales;  $\beta_{ij}$  los coeficientes de las relaciones cuadráticas;  $\beta_{ij}$  los coeficientes de las relaciones de interacción; y  $k$  el número total de factores independientes. Los términos de la ecuación final obtenida fueron analizados estadísticamente en base a los valores F de cada término.

A continuación 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.

Los análisis estadísticos (cálculo de los parámetros  $R^2$ , error cuadrático medio (ECM), el cálculo de los intervalos de confianza para el 95%, 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 de los modelos obtenidos a partir de este diseño, la estimación de los coeficientes y la evaluación del nivel de significancia de los modelos se llevaron a cabo mediante el software Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, EE.UU.)

#### **4. Resultados y discusión**

De forma general, la utilización de los PEAV como sistema de inactivación de microorganismos con el objetivo de pasteurizar alimentos líquidos, principalmente zumos, consiste en la aplicación de pulsos de anchura del orden de microsegundos y de intensidades por encima de los 10 kV/cm. Existen datos en la literatura que muestran que tratamientos con una anchura de pulso corta y una alta intensidad son más efectivos letalmente que tratamientos que administran pulsos de mayor anchura y menor intensidad de campo. Sin embargo, estos estudios se han realizado en el rango de microsegundos y campos por encima de los 10 kV/cm no existiendo datos comparables cuando se utilizan pulsos en el rango de milisegundos y menores intensidades de campo eléctrico. El debate ha surgido ya que en otras aplicaciones de los PEAV como es la extracción de componentes intracelulares de interés para la industria alimentaria, se pueden aplicar ambos tipos de pulsos, de microsegundos y altas intensidades del campo, o de milisegundos e intensidades inferiores a 10 kV/cm. La utilización de bajas intensidades y largos pulsos se ha planteado ya que los equipos que generan este tipo de pulsos son más económicos y, por tanto, con mayor viabilidad de aplicación industrial.

Esto es especialmente notable cuando los PEAV se aplican con el fin de pasteurizar alimentos líquidos en los que los tratamientos son muchos más intensos y los requerimientos de potencia de los equipos mayores. No obstante, si bien se ha estudiado el efecto de los PEAV para permeabilizar células eucariotas aplicando pulsos de distinta anchura (mili o microsegundos) y campo eléctrico, no existen datos en la literatura que permitan comparar la eficacia letal de tratamientos aplicados con mili o microsegundos sobre células procariotas como los microorganismos. De ahí la importancia de este trabajo que va a permitir por primera vez comparar la eficacia letal sobre microorganismos de pulsos de mili y microsegundos aplicados a distintas intensidades del campo eléctrico y número de pulsos para aplicar la misma energía en ambos casos y así poder comparar bajo las mismas condiciones experimentales los resultados. Además se ha incluido como variable la temperatura del medio que es un factor crítico, como se ha indicado en la introducción, en la eficacia letal del proceso.

Para ello en esta investigación se ha utilizado *Escherichia coli* O157:H7 como microorganismo de referencia utilizando como medio de tratamiento tampón McIlvaine de pH 3.5. Esto fue elegido de esta manera debido a que este microorganismo posee una resistencia elevada al tratamiento con pulsos eléctricos en este medio. El pH, como se ha comentado anteriormente, influye en los tratamientos con PEAV. Este valor de pH se ha tomado debido a que guarda estrechas similitudes con el pH que podemos encontrar en muchos alimentos, especialmente, en los zumos, que son los principales sujetos de estos tratamientos (Condón 2012).

En primer lugar se presentarán los resultados obtenidos aplicando, a distintas temperaturas, tratamientos de microsegundos e intensidades del campo eléctrico por encima de 10 kV/cm en cuanto a su eficacia letal y daño generado en la población de *E. coli* O157:H7. Posteriormente, se mostrarán los resultados obtenidos con los tratamientos de milisegundos e intensidades inferiores a 10 kV/cm. Finalmente, se compararán los resultados obtenidos con ambos equipos y se discutirá el mayor o menor efecto letal de tratamientos de mili y microsegundos.

#### **4.1. Inactivación de *E. coli* O157:H7 por PEAV con pulsos de microsegundos**

La Tabla 4.1 muestra los datos de inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenidos en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV de campo eléctrico entre 15 y 25 kV/cm y 6,8 y 180 kJ/kg a distintas temperaturas en combinaciones establecidas en base al diseño experimental. Como se observa, y de forma general, la inactivación

incrementó con la intensidad del campo eléctrico, con la temperatura del medio de tratamiento y con la energía aplicada.

T	Campo	Energía	Ciclos Log de inactivación
20	15	67,5	0,84327306
20	15	6,75	0,86124398
20	20	66	0,93270691
20	25	187,5	1,26807051
20	25	18,75	0,98992301
30	25	103,125	1,03788208
30	15	37,125	0,81653323
30	20	120	1,03454876
30	20	66	0,99743305
30	20	66	1,02895052
30	20	12	0,94942874
40	15	67,5	1,80434222
40	15	6,75	1,26271868
40	20	66	2,00595658
40	25	187,5	2,84397323
40	25	18,75	1,84790835

**Tabla 4.1** Datos de inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenidos en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV de distinto campo eléctrico, energía y temperatura

A partir de estos datos y con el fin de describir con más precisión el efecto de cada uno de los parámetros investigados, se llevó a cabo una regresión múltiple permitiendo obtener la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Log } S(t) = 3.857 - 0.266 \times T + 4.81 \times 10^{-3} \times T^2 + 8.78 \times 10^{-4} \times T \times E + 1.23 \times 10^{-4} \times T^2 \times W \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde  $\text{Log}_{10} S(t)$  son los ciclos logarítmicos de inactivación; T la temperatura de tratamiento ( $^{\circ}\text{C}$ ); E la intensidad del campo eléctrico suministrado (kV/cm); y W la energía específica de tratamiento suministrada (kJ/kg).

La tabla 4.2 muestra los coeficientes y el intervalo de confianza de los mismos para cada una de las variables del modelo así como el valor F de cada parámetro indicando su significancia en el modelo. Como se observa, la temperatura fue el factor que más influyó en la eficacia letal del tratamiento afectando incluso cuadráticamente. El campo eléctrico y la energía influyeron en menor medida estando condicionado su efecto a la temperatura de tratamiento (interacciones T\*E y T\*W). Por otro lado, la tabla 4.3 muestra la bondad del ajuste de la ecuación obtenida. Los índices  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado y el error estándar indican que el modelo describe adecuadamente los datos experimentales. Esta bondad del ajuste, se observa más gráficamente en la Figura 4.1

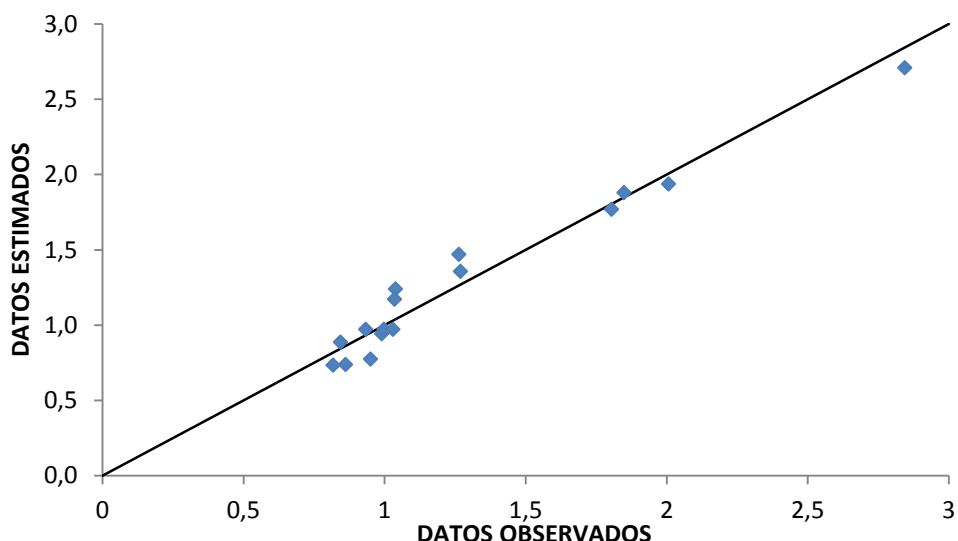
donde se muestra la relación entre los valores obtenidos experimentales y los estimados con el modelo. Como se observa los datos estimados del modelo se alinean sobre la línea de equivalencia.

$$\text{Log} = b_0 + b_1 * T^a + b_2 * T^a * T^a + b_3 * T^a * E + b_4 * T^a * W$$

		-95%	95%	VIF		
<b>b0</b>	3,857	2,545	5,168		<b> R </b>	0,979
<b>b1</b>	-0,266	-0,359	-0,173	98,89	<b>R<sup>2</sup></b>	0,958
<b>b2</b>	0,00481	0,00329	0,00634	97,03	<b>R<sup>2</sup> adjusted</b>	0,943
<b>b3</b>	0,000878	0,000200	0,00155	3,383	<b>Error estandar</b>	0,134
<b>b4</b>	0,000123	7,44391E-05	0,000171	1,413		

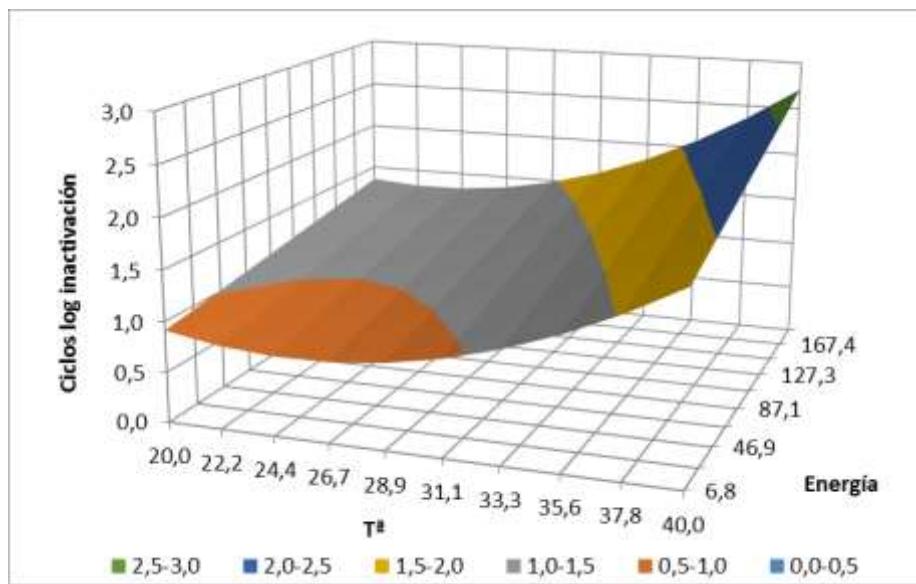
**Tabla 4.2** Coeficientes, intervalos de confianza y valores F de cada parámetro del modelo.

**Tabla 4.3** Bondad del ajuste



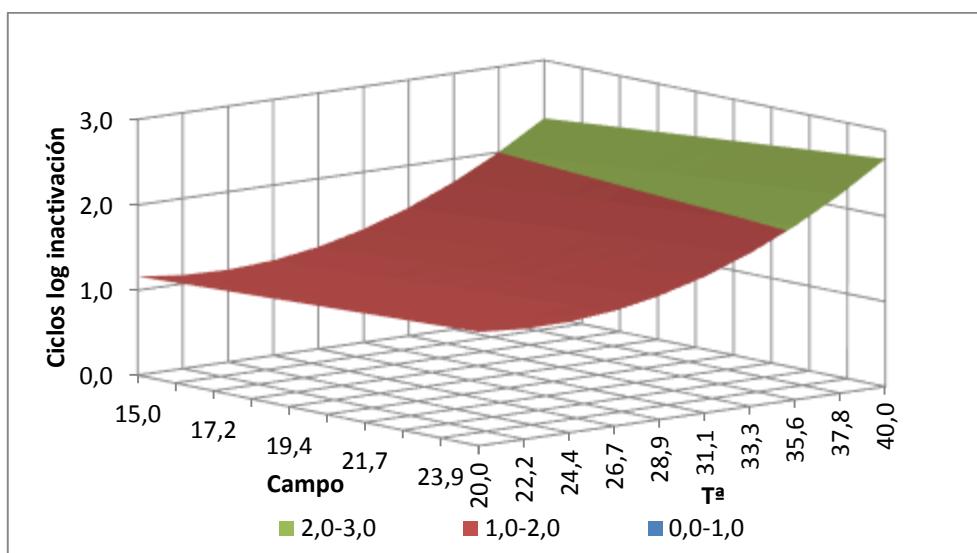
**Figura 4.1** Relación entre los valores obtenidos experimentales y los estimados con el modelo.

Gracias a la ecuación desarrollada, se construyeron las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4. La figura 4.2 muestra la gráfica de superficie respuesta que relaciona la influencia de la temperatura y de la energía específica aplicada en la inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenida por ejemplo a 25 kV/cm. Gráficas similares se obtuvieron a otras intensidades de campo eléctrico dentro del rango investigado. Como se observa, la inactivación incrementó linealmente con la energía, pero cuadráticamente con la temperatura como quedaba indicado en la Ecuación 4.1. Esto significa que existen temperaturas que al aplicar PEAV apenas tienen efecto sobre la inactivación; sin embargo, a partir de un determinado valor (alrededor de los 27°C), la inactivación incrementa notablemente. Por ejemplo de 1 ciclo logarítmico a 20°C hasta casi los 3 log a 40 °C.



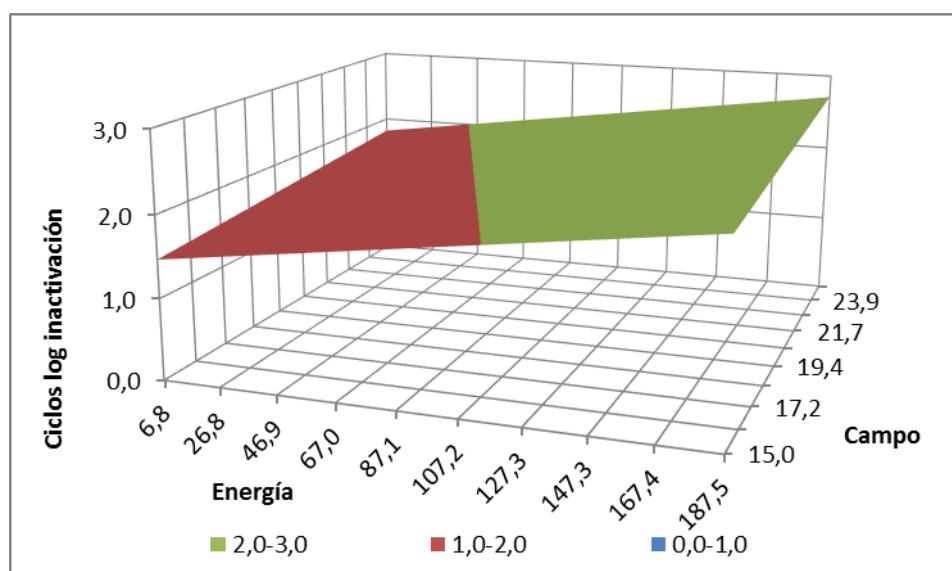
**Figura 4.2** Gráfica de superficie-respuesta obtenida aplicando la ecuación 4.1 que relaciona los ciclos logarítmicos de inactivación con la energía y la temperatura PEAV aplicados a 25 kV/cm..

De modo similar a lo presentado en la figura 4.2, la figura 4.3 presenta la gráfica de superficie respuesta que relaciona la influencia de la intensidad del campo eléctrico y de la temperatura en la inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenida por ejemplo a 180 kJ/kg. Gráficas similares se obtuvieron a otras energías aplicadas dentro del rango investigado. Como se observa, de nuevo la inactivación incrementó cuadráticamente con siendo 27°C la temperatura a partir de la cual este factor influyó notablemente. Por otro lado, la intensidad del campo eléctrico también incrementó en la inactivación microbiana sin embargo este efecto fue poco marcado a bajas temperaturas siendo algo más notable a temperaturas de 40°C.



**Figura 4.3** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.1 que relaciona los ciclos logarítmicos de inactivación conseguidos al aplicar distintos campo eléctricos y temperatura con tratamientos PEAV de 180 kJ/kg..

Finalmente, la ecuación 4.1 también ha permitido obtener la Figura 4.4. Esta figura corresponde a la gráfica de superficie respuesta que relaciona la influencia de la intensidad del campo eléctricos y de la energía específica aplicada en la inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenida por ejemplo a 40°C. Como se observa, la inactivación incrementó linealmente con la energía y con la intensidad del campo eléctrico. La inactivación varió de los 1,5 ciclos logarítmicos a las intensidades del campo y energía aplicados hasta más de 2,5 ciclos logarítmicos a 25 kV/cm y 180 kJ/kg. Gráficas y conclusiones similares se obtuvieron a otras temperaturas dentro del rango investigado.



**Figura 4.4** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.1 con una temperatura constante de 40°C que relaciona los ciclos logarítmicos de inactivación con la energía y el campo suministrado.

En resumen, se observa que la temperatura es el factor que más ha influido en la inactivación de *E. coli* O157:H7 dentro del rango de condiciones investigadas. Como ya se ha indicado en la introducción, la aplicación de pulsos eléctricos a temperaturas subletales se está investigado como estrategia para incrementar la eficacia letal de estos tratamientos PEAV o para reducir la intensidad de los mismos para conseguir un determinado nivel de inactivación microbiana en alimentos. Así como se observa, un tratamiento que inactiva 1,5 ciclos logarítmicos (180 kJ/kg a 25 kV/cm) a 27°C, permitió inactivar casi 3 log cuando el mismo tratamiento se aplicó a 40°C. Este mayor efecto letal de los tratamientos PEAV a mayores temperaturas se ha achacado a la influencia de la temperatura en la transición de fase de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática de una estructura de gel a líquido-crystalina, lo que puede afectar a la estabilidad de la membrana celular (Jayaram y col., 1993; Saldaña y col., 2010)

#### 4.1.1 Generación de daño subletal debido a la aplicación de tratamientos PEAV

Los resultados obtenidos mediante la siembra de microorganismos en un medio no selectivo se corresponden con el objetivo de recuperar el mayor número de células que hayan sobrevivido al tratamiento, tanto vivas como dañadas. Con las mismas características que las originales y sin sobreestimar la efectividad letal del tratamiento. En este estudio, también se ha investigado si los tratamientos con PEAV causan daño subletal en los microorganismos que se detecta cuando se recuperan los micoorganismos en una medio selectivo donde sólo crecen microorganismos vivos no dañados por los tratamientos. La diferencia entre los ciclos de inactivación determinados con un medio no selectivo y otro selectivo se usó para calcular este daño subletal. Así y de forma paralela al estudio realizado en el apartado anterior, se investigó la recuperación de *E. coli* O157:H7 tras la aplicación de PEAV en un medio selectivo (TSA-EL con un 3% de NaCl). En este caso, en la tabla 4.1.1 se muestra no la inactivación obtenida al recuperar los microorganismos en el medio selectivo, sino los ciclos logarítmicos de células dañadas tras la aplicación de los distintos tratamientos.

T <sup>a</sup>	Campo	Energía	CICLOS DE DAÑO SUBLETAL
20	15	67,5	0,30
20	15	6,75	0,01
20	20	66	0,77
20	25	187,5	1,34
20	25	18,75	0,86
30	25	103,125	2,08
30	15	37,125	0,81
30	20	120	2,15
30	20	66	1,60
30	20	66	1,32
30	20	12	0,81
40	15	67,5	1,28
40	15	6,75	1,74
40	20	66	1,36
40	25	187,5	0,12
40	25	18,75	0,24

**Tabla 4.1.1** Número de células dañadas de *E. coli* O157:H7 en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV de distinto campo eléctrico, temperatura y energía específica.

De forma general, se observa que en los tratamientos de intensidad intermedia es donde mayor número de células dañadas se detecta. Con el fin de describir con más

precisión el efecto de cada uno de los parámetros investigados, se llevó a cabo una regresión múltiple permitiendo obtener la siguiente ecuación matemática:

$$\begin{aligned} \text{Log } S(t) = & -9.889 + 0.506 \times T + 0.312 \times E - 0.4 \times 10^{-2} \times T^2 - 1.14 \times 10^{-2} \times T \\ & \times E - 9.73 \times 10^{-4} \times E \times W - 1.1 \times 10^{-4} \times W^2 \end{aligned}$$

(Ecuación 4.2)

donde  $\text{Log}_{10} S(t)$  es el daño; T la temperatura de tratamiento ( $^{\circ}\text{C}$ ); E la intensidad del campo eléctrico suministrado ( $\text{kV/cm}$ ); y W la energía específica ( $\text{kJ/kg}$ ).

$$\text{Log } S = b_0 + b_1 \cdot T + b_2 \cdot E + b_3 \cdot T \cdot T + b_4 \cdot T \cdot E + b_5 \cdot E \cdot W + b_6 \cdot W \cdot W$$

		-95%	95%	VIF			
<b>b0</b>	-9,889	-15,66		-4,122			
<b>b1</b>	0,506	0,179	0,834	142,15	R	0,896	
<b>b2</b>	0,312	0,115	0,509	12,88	$R^2$	0,804	
<b>b3</b>	-0,00440	-0,00943	0,000636	122,41	$R^2$ adjusted	0,673	
<b>b4</b>	-0,01140	-0,01753	-0,00526	32,25	Error estandar	0,384	
<b>b5</b>	0,000973	8,29E-05	-0,00186	33,05			
<b>b6</b>	-0,000110	-0,000219	-1,29E-05	30,76			

**Tabla 4.1.2** donde se muestra el valor F e intervalo de confianza de cada parámetro del modelo.

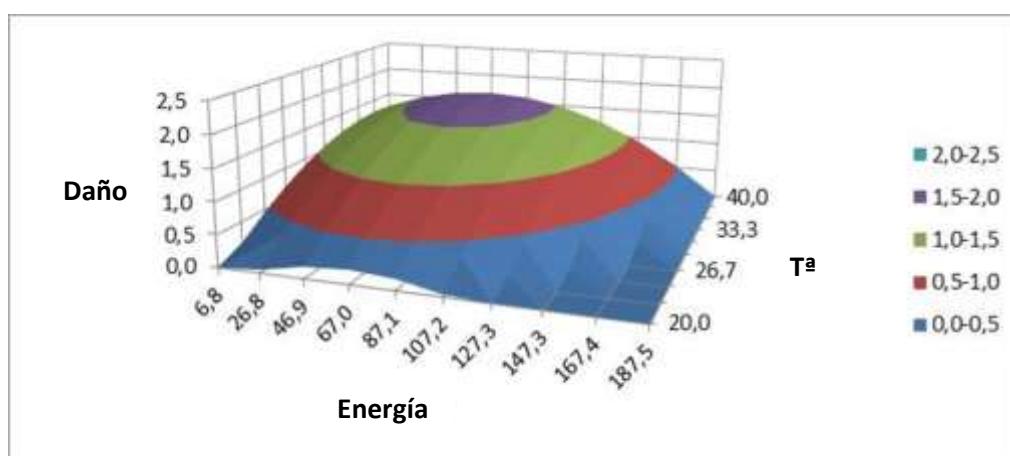
**Tabla 4.1.3** Bondad del ajuste

La tabla 4.1.2 muestra los coeficientes y sus intervalos de confianza de cada una de las variables del modelo así como el valor F de los mismos. Como se observa, de nuevo la temperatura fue el factor que más influyó en la eficacia letal del tratamiento afectando cuadráticamente. La energía y el campo eléctrico afectaron en menor medida estando condicionado su efecto a la temperatura de tratamiento (interacciones  $T \cdot E$  y  $T \cdot W$ ). Por otro lado, la tabla 4.1.3 muestra la bondad del ajuste de la ecuación obtenida. En este caso, los índices obtenidos son algo peores que en la regresión anterior, pero el objetivo de esta ecuación en este caso es evaluar cuál de los parámetros tiene más influencia y las condiciones en las que se detecta mayor daño más que estimar con precisión los ciclos de células dañadas.

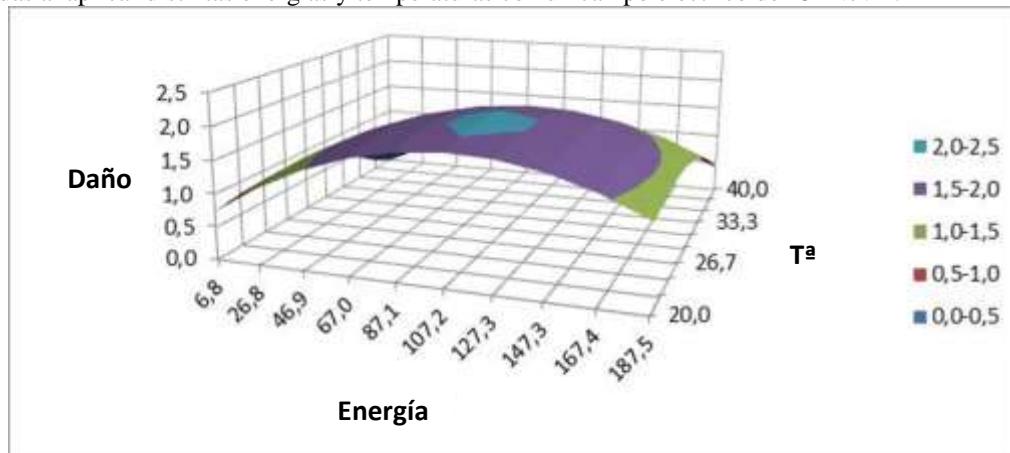
A partir de la ecuación 4.2, se pueden obtener las siguientes gráficas de superficie-respuesta en las que se describe la relación entre la temperatura y la energía específica aplicada a campos eléctricos de 15 y 25  $\text{kV/cm}$  (figuras 4.1.1, 4.1.2 y 4.1.3). Como se observa, el mayor número de células dañadas se produce en los valores intermedios de temperatura (alrededor de  $27^{\circ}\text{C}$ ) y energía (90  $\text{kJ/kg}$ ) a las distintas

intensidades del campo eléctrico, siendo ligeramente superior cuanto más elevado sea el campo eléctrico aplicado (a 25 kV/cm se consigue hasta 2 ciclos logarítmicos de células dañadas; mientras que a 15 o 20 kV/cm –datos no mostrados-, 1,0 y 1,6 ciclos de daño, respectivamente). Estas condiciones de máximo daño corresponden a los puntos de inflexión de inactivación microbiana indicados anteriormente. Es decir, a unos 27°C que es cuando comienza a tener efecto la temperatura en la inactivación microbiana y ésta no es muy elevada, es cuando se detecta mayor daño celular. Esto indicaría que estas temperaturas producirían una modificación de las envolturas que harían más susceptibles a las células al efecto de los PEF produciendo un daño no reparable cuando los microorganismos se recuperan en un medio selectivo.

La existencia de esta población dañada subletalmente resulta interesante desde un punto de vista práctico ya que permitiría incrementar la eficacia letal de los tratamientos PEAV al desarrollar procesos combinados entre PEAV y otras tecnologías (por ejemplo el uso de antimicrobianos) que permitirían inactivar esta población dañada subletalmente (Raso & Barbosa-Cánovas, 2003; Monfort y col. 2010)



**Figura 4.1.1** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.2 que relaciona el número de células dañadas al aplicar distintas energías y temperaturas con un campo eléctrico de 15 kV/vm.



**Figura 4.1.2** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.2 que relaciona el número de células dañadas al aplicar distintas energías y temperaturas con un campo eléctrico de 25 kV/vm.

## 4.2 Inactivación de *E. coli* O157:H7 por tratamientos PEAV de pulsos de milisegundos

La Tabla 4.4 muestra los datos de inactivación obtenidos de *E. coli* O157:H7 en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV de campo eléctrico de entre 4 y 7 kV/cm y 24 y 1500 kJ/kg a distintas temperaturas en combinaciones establecidas en base al diseño experimental. Como se observa, y de forma similar a los microsegundos, la inactivación incrementó con la intensidad del campo eléctrico, la temperatura del medio de tratamiento y la energía aplicada.

T <sup>a</sup>	Campo	Energía	Ciclos Log de inactivación	T <sup>a</sup>	Campo	Energía	Ciclos Log de inactivación
<b>20</b>	10	150	0,83	<b>34</b>	7	735	3,07
<b>20</b>	10	810	2,19	<b>34</b>	4	24	0,0054
<b>20</b>	10	1500	2,17	<b>34</b>	4	129,6	0,12
<b>20</b>	7	73,5	0,14	<b>34</b>	4	240	0,22
<b>20</b>	7	396,9	0,056	<b>42</b>	10	150	3,23
<b>20</b>	7	735	0,12	<b>42</b>	10	810	4,64
<b>20</b>	4	24	0,15	<b>42</b>	10	1500	4,24
<b>20</b>	4	129,6	0,12	<b>42</b>	7	73,5	1,73
<b>20</b>	4	240	0,017	<b>42</b>	7	396,9	3
<b>34</b>	10	150	2,69	<b>42</b>	7	735	3,08
<b>34</b>	10	810	3,29	<b>42</b>	4	24	0
<b>34</b>	10	1500	4,72	<b>42</b>	4	129,6	0,17
<b>34</b>	7	73,5	0,88	<b>42</b>	4	240	1,62
<b>34</b>	7	396,9	2,55				

**Tabla 4.4** Datos de inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenidos en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV de distinto campo eléctrico, energía y temperatura

Con el fin de describir con más precisión el efecto de cada uno de los parámetros investigados, se llevó a cabo una regresión múltiple permitiendo obtener la siguiente ecuación matemática:

$$\begin{aligned} \text{Log } s(t) = & 1.955 - 0.108 \times T - 0.374 \times E - 1.834 \times 10^{-2} \times W + 2.303 \times 10^{-2} \times T \times E \\ & + 8.52 \times 10^{-4} \times T \times W + 1.52 \times 10^{-3} \times E \times W \end{aligned}$$

(Ecuación 4.3)

donde  $\text{Log}_{10} S(t)$  son los ciclos logarítmicos de inactivación; T la temperatura de tratamiento ( $^{\circ}\text{C}$ ); E la intensidad del campo eléctrico suministrado (kV/cm); y W la energía específica (kJ/kg).

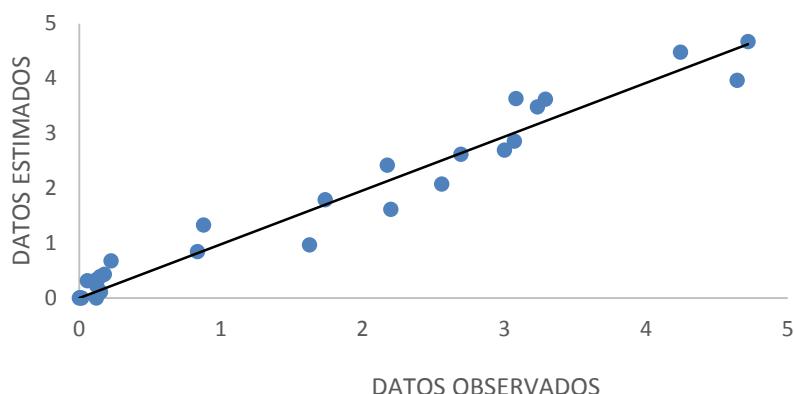
La tabla 4.5 muestra el intervalo de confianza de los coeficientes de cada una de las variables del modelo así como el valor F de cada parámetro indicando su significancia en el modelo y la tabla 4.6 y la figura 4.5 la bondad del ajuste de la ecuación obtenida. Como se observa, la energía y su combinación con la temperatura fueron los factores que más influyeron en la eficacia letal del tratamiento. El campo eléctrico influyó en menor medida estando condicionado su efecto a la energía. En comparación con el modelo obtenido mediante el tratamiento en microsegundos se puede observar que se ha obtenido un modelo más complejo, con una mayor interacción de los parámetros entre sí, donde la temperatura tiene una gran importancia, como en el caso de los microsegundos, pero dependiente de la energía aplicada

$$\begin{aligned} \log s(t) = & b_0 + b_1 * T^a + b_2 * E + b_3 * W + b_4 * T^a * E + b_5 * T^a * W \\ & + b_6 * E * W + b_7 * T^a * T^a * W + b_8 * T^a * E * W \end{aligned}$$

	-95%	95%	VIF		
<b>b0</b>	1,95	-0,58	4,49		
<b>b1</b>	-0,10	-0,18	-0,031	17,83	
<b>b2</b>	-0,37	-0,73	-0,011	29,15	
<b>b3</b>	-0,018	-0,0282	-0,0084	752,20	
<b>b4</b>	0,023	0,0121	0,033	46,93	R  0,977
<b>b5</b>	0,00085	0,00044	0,0012	1488,0	R2 0,955
<b>b6</b>	0,00152	0,00058	0,0024	700,51	R2 adjusted 0,935
<b>b7</b>	-5,60E-06	-1,05E-05	-6,97E-07	342,33	
<b>b8</b>	-5,23E-05	-8,04E-05	-2,42E-05	736,16	Error estandar 0,406

**Tabla 4.5** Coeficientes, intervalos de confianza y valores F de cada parámetro del modelo.

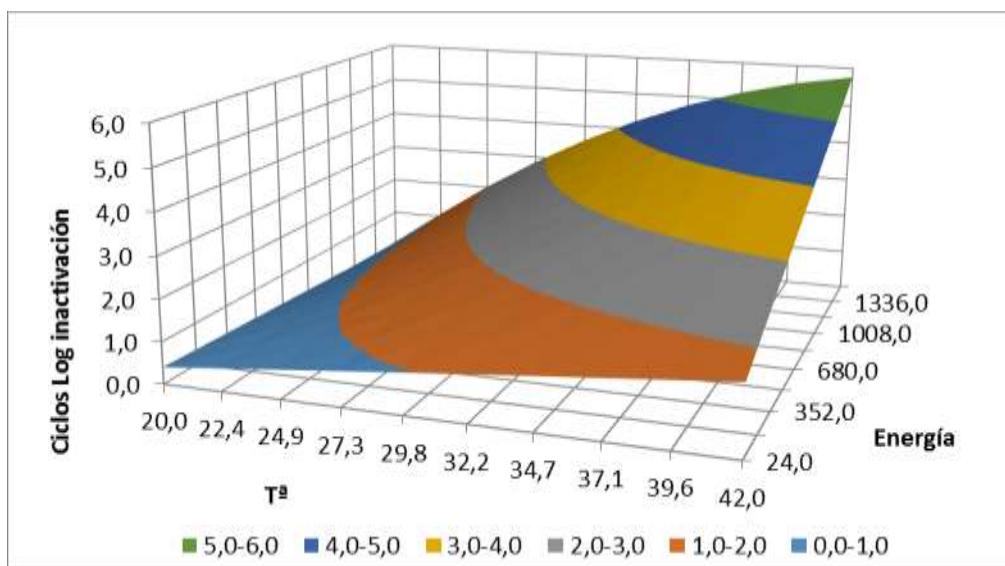
**Tabla 4.6** Bondad del ajuste



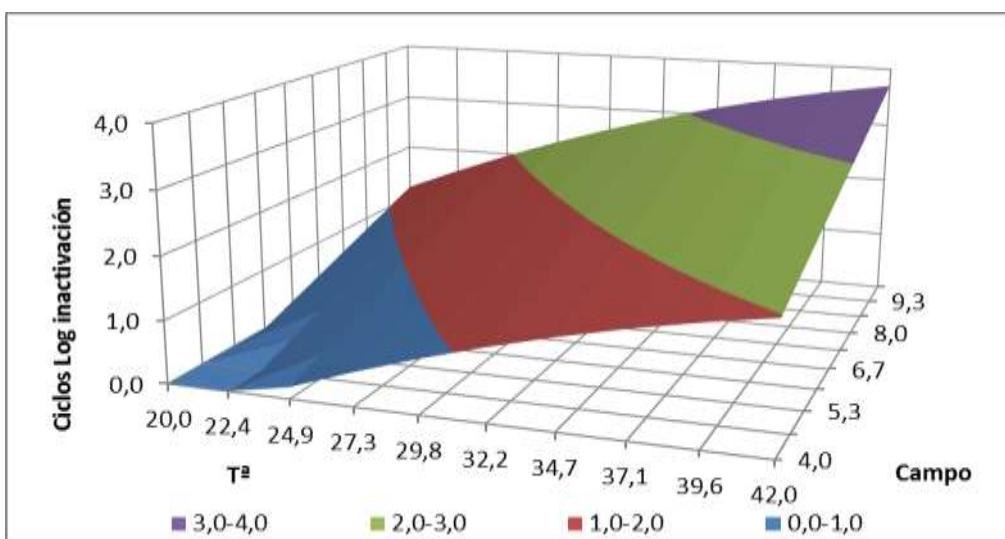
**Figura 4.5** Relación entre los valores obtenidos experimentales y los estimados con el modelo.

En base a la ecuación 4.3, se han construido las figuras 4.7 y 4.8. Atendiendo a lo observado en estas se deduce que la evolución de la inactivación microbiana depende en gran medida de la temperatura aplicada sobre todo cuando se aplican los mayores

niveles de energía. Como se observa, un tratamiento a la máxima energía (1500 kJ/Kg) a 7 kV/cm aplicado a 40 °C en vez de 20 °C incrementaría hasta casi 4 log la eficacia letal del tratamiento. Ninguno de los otros parámetros estudiados en el rango investigado permitió producir un incremento tan notable en la eficacia letal del proceso (figura 4.8). En cualquier caso, el efecto del campo eléctrico también condicionó notablemente la eficacia letal del proceso estando muy condicionado por la temperatura de tratamiento (figura 4.8). Es decir, la temperatura tanto cuando se aplican mili o microsegundos, es un factor de gran importancia en la tecnología de los PEAV.



**Figura 4.7** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.3 que relaciona los ciclos logarítmicos de inactivación conseguidos al aplicar distintas energías y temperatura con tratamientos PEAV de 7 kV/cm.



**Figura 4.8** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.3 que relaciona los ciclos logarítmicos de inactivación conseguidos al aplicar distintos campos y temperatura con tratamientos PEAV de 451 kJ/kg.

#### 4.2.1 Generación de daño subletal debido a la aplicación de tratamientos PEAV

De forma paralela al estudio realizado en el apartado anterior, se investigó la recuperación de *E. coli* O157:H7 tras la aplicación de PEAV en un medio selectivo (TSA-EL con un 3% de NaCl). La tabla 4.2.1 muestra los ciclos logarítmicos de células dañadas como consecuencia de la aplicación de los distintos tratamientos aplicados.

T <sup>a</sup>	Campo	Energía	CICLOS DE DAÑO SUBLETAL	T <sup>a</sup>	Campo	Energía	CICLOS DE DAÑO SUBLETAL
20	10	150	1,78	34	7	735	0,69
20	10	810	1,67	34	4	24	1,41
20	10	1500	2,73	34	4	129,6	1,78
20	7	73,5	1,18	34	4	240	2,06
20	7	396,9	1,76	42	10	150	1,33
20	7	735	2,10	42	10	810	0
20	4	24	0,24	42	10	1500	1,11
20	4	129,6	0,35	42	7	73,5	0,51
20	4	240	0,41	42	7	396,9	0
34	10	150	0,25	42	7	735	0
34	10	810	0,40	42	4	24	0,36
34	10	1500	0,21	42	4	129,6	0,84
34	7	73,5	1,98	42	4	240	0
34	7	396,9	0,44				

**Tabla 4.2.1** Número de células dañadas de *E. coli* O157:H7 en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV de distinto campo eléctrico, temperatura y energía específica.

A partir de estos datos, se ha obtenido la siguiente ecuación que permite determinar la influencia de los parámetros PEAV en la creación de daño subletal.

$$\begin{aligned} \text{Log } s(t) = & -30.01 + 1.861 \times T + 5.507 \times E + 1.84 \times 10^{-3} \times W - 2.666 \times 10^{-2} \\ & \times T^2 - 0.284 \times T \times E - 9.81 \times 10^{-5} \times T \times W - 0.163 \times E^2 + 3.51 \\ (\text{Ecuación 4.4}) \quad & \times 10^{-3} \times T^2 \times E + 4.49 \times 10^{-3} \times T \times E^2 + 2.92 \times 10^{-8} \times T \times W^2 \end{aligned}$$

donde Log<sub>10</sub> S(t) es el daño; T la temperatura de tratamiento (°C); E la intensidad del campo eléctrico suministrado (kV/cm); y W la energía específica (kJ/kg).

La tabla 4.2.2 muestra los coeficientes de cada una de las variables del modelo, el intervalo de confianza de dichos coeficientes así como el valor F de cada parámetro indicando su significancia en el modelo. Como se observa, la interacción entre la temperatura y el campo fueron los factores que más influyeron en la generación de daño, siendo importante también la relación cuadrática de ambos parámetros. En el caso

de la energía, es el parámetro que menos influencia tiene en la generación del daño de forma similar a lo que sucedía en la ecuación obtenida para los microsegundos. Por otro lado, la tabla 4.1.3 muestra la bondad del ajuste de la ecuación obtenida. Los índices  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado y el error estándar indican que el modelo describe adecuadamente los datos experimentales aunque los índices son inferiores a los obtenidos en otros modelos, pero similares a los del daño generado por los microsegundos. Independientemente de esto, el modelo sirve para identificar qué factores y en qué rango se genera la mayor cantidad de daño, y, por tanto, las condiciones en las que se pueden desarrollar procesos combinados que aumenten la eficacia letal del proceso.

$$\text{daño} = b_0 + b_1*T + b_2*E + b_3*W + b_4*T*T + b_5*T*E + b_6*T*W + \\ b_7*E*E + b_8*T*T*E + b_9*T*E*E + b_{10}*T*W*W$$

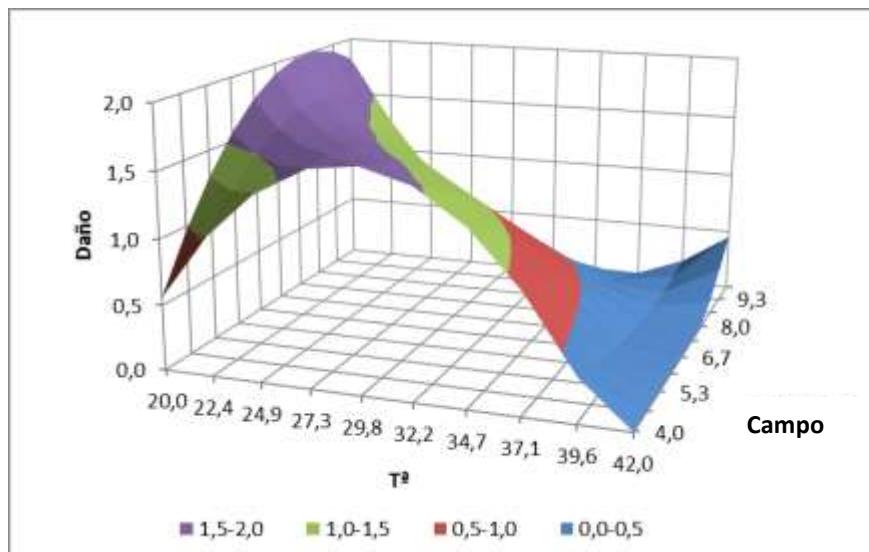
		-95%	95%	VIF	$R^2$	$R^2$ adjusted	Error estandar
<b>b0</b>	-30,01	-40,17	-19,84				
<b>b1</b>	1,861	1,255	2,467	1152,5			
<b>b2</b>	5,507	3,258	7,757	1152,6			
<b>b3</b>	0,0018	0,000178	0,00350	21,77			
<b>b4</b>	-0,026	-0,03608	-0,01724	1049,1			
<b>b5</b>	-0,284	-0,382	-0,186	3893,4			
<b>b6</b>	-9,81E-05	-0,000161	-3,49E-05	37,49			
<b>b7</b>	-0,163	-0,304	-0,02255	896,40			
<b>b8</b>	0,00351	0,00224	0,00478	1499,3			
<b>b9</b>	0,00449	0,000240	0,00875	1078,9			
<b>b10</b>	2,93E-08	2,85E-09	5,57E-08	14,36	<b>0,849</b>	0,755	0,398

**Tabla 4.2.2** Coeficientes, intervalos de confianza y valores F de cada parámetro del modelo.

**Tabla 4.2.3** Bondad del ajuste

A partir de la ecuación 4.4, se pueden obtener las siguientes gráficas de superficie-respuesta en las que se describe la relación entre la temperatura y el campo eléctrico a una energía específica de, por ejemplo, 750 kJ/kg (figuras 4.2.1). Como se observa, el campo eléctrico tiene mucho efecto en la generación de daño a bajas temperaturas y menos a temperaturas más elevadas. En el caso de la temperatura, esta afecta en gran medida especialmente a los 27-28°C a bajas intensidades del campo eléctrico, mientras que a los campos más altos, el daño se genera cuanto menos es la temperatura. Estos resultados tienen cierta similitud con los obtenidos en microsegundos en los que a las temperaturas indicadas y a campos menores es donde mayor daño se observa. Al igual que antes, sería en estas condiciones en las que se debería desarrollar procesos combinados que permitan inactivar a las células dañadas incrementando la eficacia letal de los tratamientos. Es decir, independientemente de la anchura de pulso aplicada, la generación de daño celular se produce en mayor medida a unas temperaturas aproximadas de unos 27 °C y a intensidades intermedias o bajas de campo eléctrico y

energía en los rangos investigados. La existencia de una temperatura, a partir de la cual se observan distintos comportamiento independientemente de la anchura de pulso aplicado, podría indicar que a esas temperaturas se estaría produciendo cambios estructurales que condicionarían la viabilidad celular dependiendo de las condiciones de recuperación tras los tratamientos.



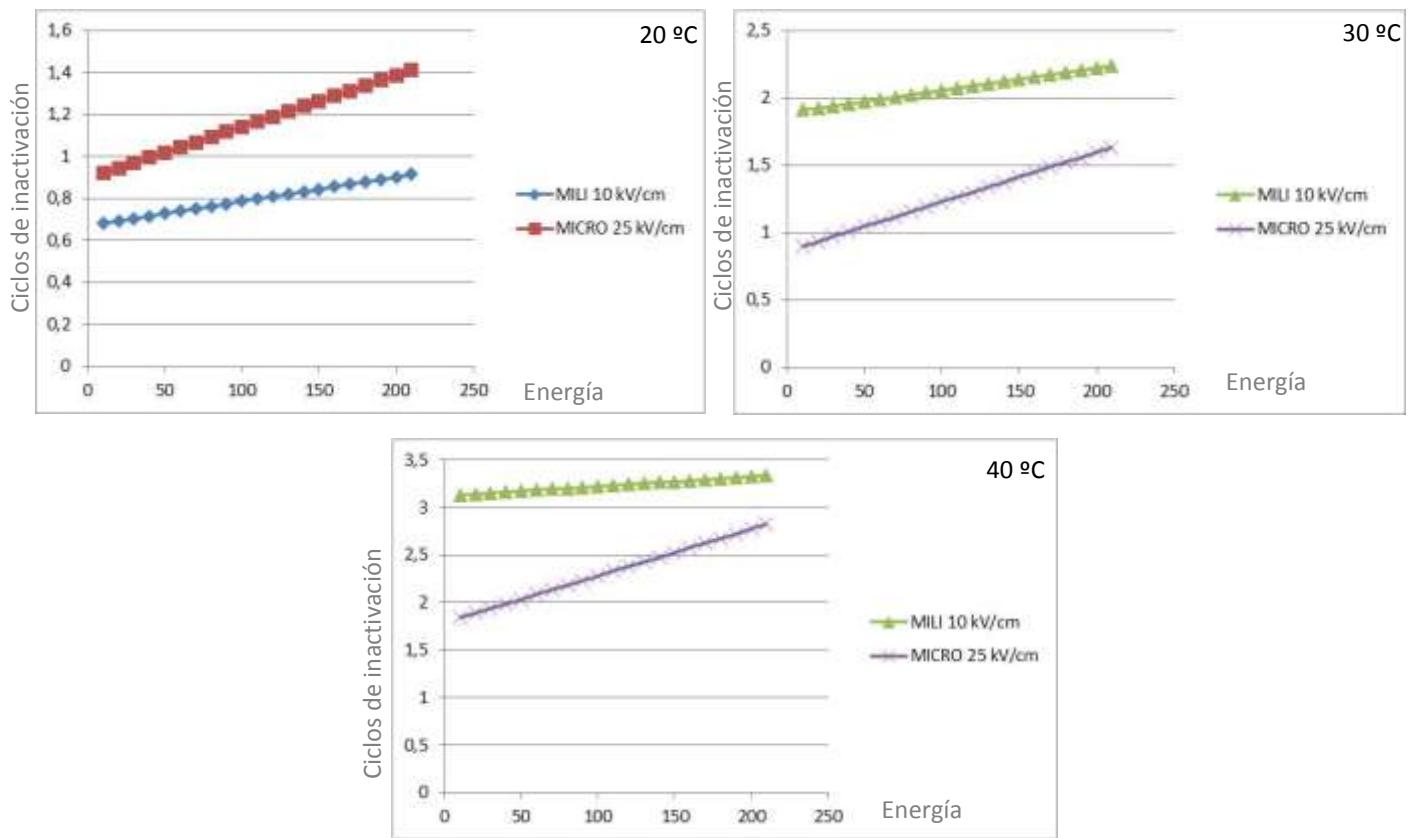
**Figura 4.2.1** Gráfica de superficie obtenida aplicando la ecuación 4.4 que relaciona el número de células dañadas al aplicar distintos campos y temperaturas con una energía de 750 kJ/kg.

### 4.3 Comparación de los modelos de microsegundo y milisegundos en la eficacia letal de los tratamientos

Una vez descritos los modelos realizados para cada experimento, microsegundos y milisegundos, se hizo una comparación entre ambos con el fin de determinar cuál de los dos tipos de pulsos pueden resultar más beneficiosos, es decir, que permitan obtener la mayor inactivación con el menor consumo energético o con el menor tiempo de tratamiento. De este modo, se van a realizar comparaciones entre tratamientos en los que se hayan aplicado las condiciones más similares o determinar el nivel de inactivación de determinados tratamientos. En cualquier caso, y antes de realizar este análisis, hay que destacar que la temperatura es el parámetro que más ha influenciado en la eficacia letal del proceso independientemente de la anchura del pulso aplicado, estando muy condicionado por la intensidad del campo eléctrico sobre todo cuando se aplicaron milisegundos.

En primer lugar, se ha determinado el nivel de inactivación alcanzado con distintos niveles energéticos aplicados con mili o microsegundos. Necesariamente, la

intensidad del campo eléctrico es distinta para ambos casos ya que se estarían extrapolando resultados fuera del rango de los modelos desarrollados. Las figuras 4.5.1, 4.5.2 y 4.5.3 muestran los ciclos de inactivación estimados tras la aplicación de tratamientos PEAV con mili y microsegundos de 10 y 25 kV/cm, respectivamente, de distinto nivel energético y temperaturas del medio 20, 30 y 40 °C.



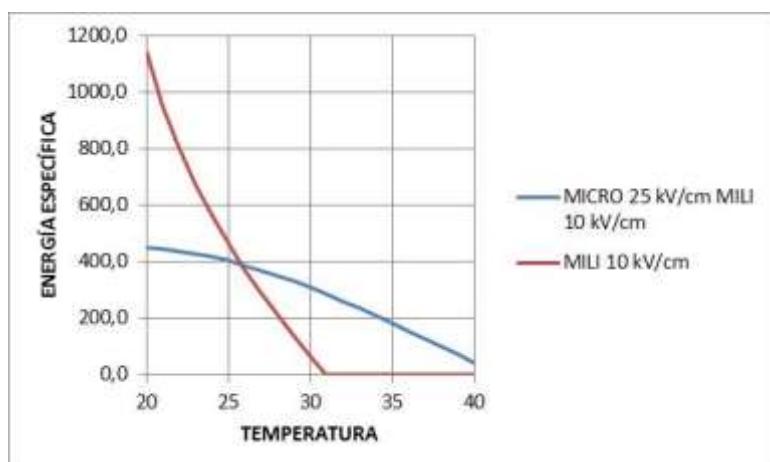
**Figura 4.5.1, 4.5.2 y 4.5.3** Ciclos logarítmicos de inactivación conseguidos aplicando tratamientos de milisegundos (10 kV/cm) y microsegundos (25 kV/cm) de distinta energía y a temperaturas de 20, 30 y 40 °C.

Como se observa, en todos los casos la inactivación se incrementó con la energía aplicada. Dependiendo de la temperatura de tratamiento, el efecto de los mili y microsegundos fue diferente: a 20°C, los microsegundos fueron más eficaces letalmente que los milisegundos, ya que permiten una mayor inactivación para un mismo nivel energético aplicado, mientras que a 30 y 40°C, los milisegundos serían de elección. Es decir, tratamientos de alta intensidad y corta duración serían más adecuados para la inactivación microbiana a temperaturas más bajas, mientras que a temperaturas

mayores, parecen más eficaces tratamientos de menor intensidad del campo eléctrico y mayor tiempo.

Con el fin de determinar con mayor precisión la temperatura a partir de la cual los milisegundos son más eficaces letalmente que los microsegundos, se ha construido la figura 4.5.4. En ella, se muestran las combinaciones energía-temperatura a campos de 25 y 10 kV/cm para tratamientos aplicados con micro y milisegundos respectivamente, a partir de los cuales, se consiguen 2 ciclos logarítmicos de inactivación. Como se observa, hasta aproximadamente los 27°C los tratamientos aplicados con microsegundos resultan más eficaces letalmente, mientras que a temperaturas superiores, serían los milisegundos los más adecuados. Los resultados obtenidos a menores temperaturas concuerdan con los datos existentes en la literatura. Sin embargo, debido a que es la primera vez que se realiza un estudio como este a distintas temperaturas de procesado, se ha podido observar que cuando la temperatura es más elevada, los milisegundos resultan más eficaces desde un punto de vista de inactivación microbiana.

Por otro lado, esta gráfica también permite observar que el efecto de la temperatura es mucho más marcado al aplicar milisegundos que microsegundos. Así un incremento de la temperatura reduce notablemente el consumo energético del proceso cuando se aplican milisegundos más que cuando se aplican microsegundos. Un aumento de 10°C la temperatura de tratamiento permitiría disminuir unos 1000 kJ/kg la energía necesaria para reducir 2 ciclos logarítmicos la población de *E. coli* O157:H7 con pulsos de milisegundos de 10 kV/cm, mientras que con microsegundos esta reducción sería de unos 150 kJ/kg a 25 kV/cm.



**Figura 4.5.4** Condiciones para 2 log con micro a 25 kV/cm y milisegundos con 10 kV/cm.

Si bien parece ser más ventajoso el uso de los milisegundos, los requerimientos energéticos son excesivamente elevados si se considera su aplicación industrial en la que los tratamientos se aplican de forma continua, a diferencia de este estudio que se ha hecho de forma discontinua para evitar un incremento de la temperatura del medio que puede influir en los resultados, y en la que toda la energía aplicada se transforma en calor debido al efecto Joule. Es por ello que se estima, que la máxima energía a aplicar sería entre 200 y 250 kJ/kg con el fin de que la temperatura final del proceso no sea tan elevada que produzca la muerte microbiana por el calor y no por los PEAV.

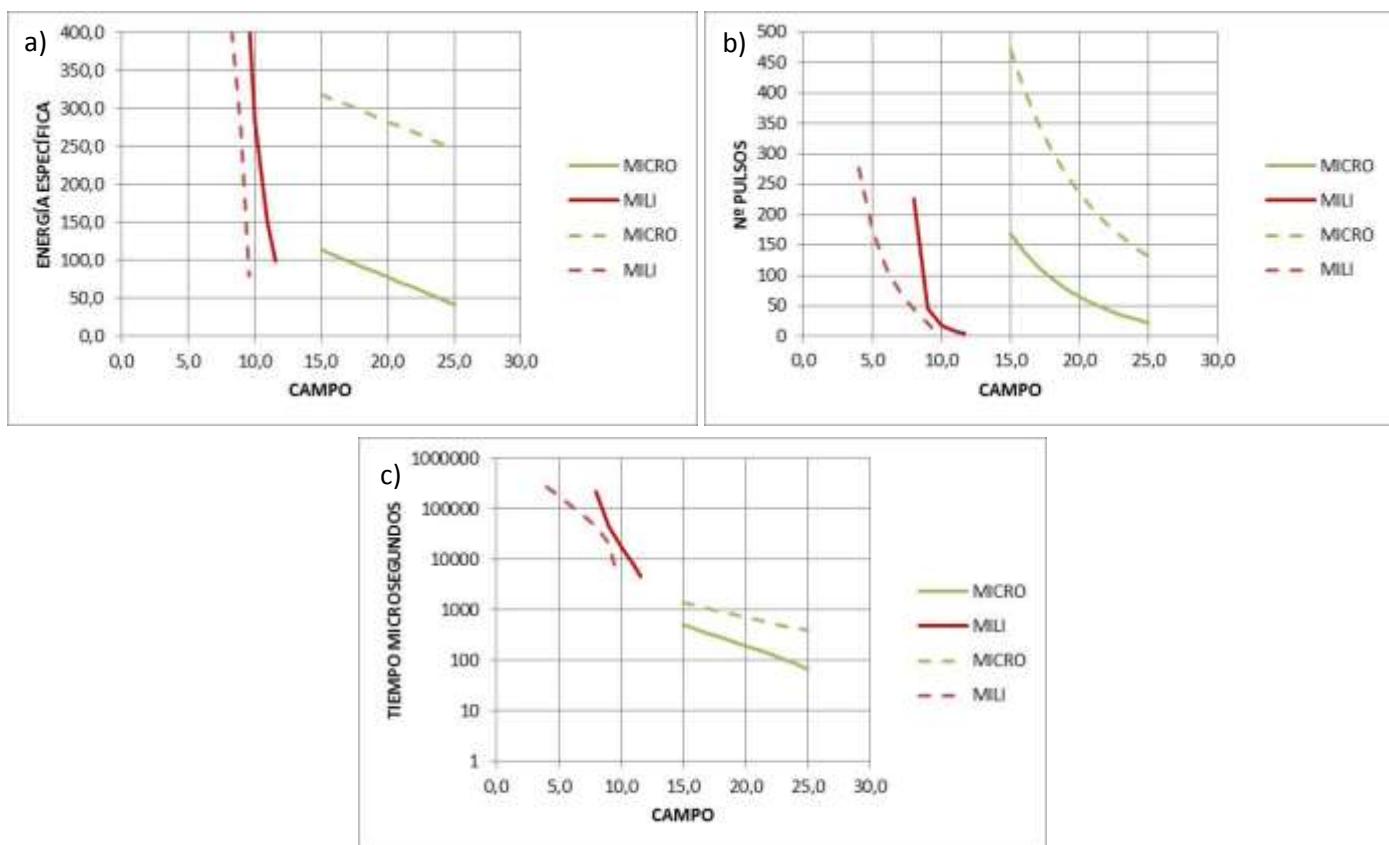
Con el fin de comparar con mayor detalle el efecto de los PEAV en un rango de trabajo aplicable a escala industrial y en un amplio rango de condiciones para comparar el efecto de aplicar tratamientos de mili y microsegundos, se ha obtenido la gráfica de la figura 4.5.5. En ella, se muestra la energía necesaria para inactivar 1 y 2 ciclos logarítmicos de la población de *E. coli* O157:H7 a distintas intensidades del campo eléctrico y a temperaturas de 20 y 40 °C respectivamente, utilizando pulsos de mili y microsegundos. Como se observa, el campo eléctrico afecta en gran medida en la eficacia letal de los tratamientos cuando se aplican en milisegundos permitiendo reducir notablemente el coste energético del proceso. No obstante, para conseguir la inactivación a 20 °C, la aplicación de microsegundos requiere niveles energéticos mucho menores que con milisegundos. En el caso de los milisegundos, se requieren niveles superiores a 100 kJ/kg mientras que con microsegundos, inferiores a este valor.

No obstante, cuando la temperatura de trabajo fue superior, la aplicación de milisegundos podría resultar interesante ya que se podría reducir tanto el coste energético del proceso como la intensidad de tratamiento debido al mayor efecto sensibilizante de la temperatura frente a los PEAV al aplicar milisegundos. Si bien estos resultados son de gran interés práctico sería muy interesante realizar experimentos a mayores niveles de inactivación (aumentando la intensidad de los tratamientos o la temperatura del medio de tratamiento) aunque en esas circunstancias se podrían alcanzar temperaturas que podrían producir daño celular o incluso la inactivación por calor de los microorganismos.

Si bien cuando se aplican temperaturas más elevadas, el uso de pulsos de milisegundos podría resultar de mayor interés con el fin de inactivar microorganismos. Sin embargo se ha de considerar que el tiempo de tratamiento aplicado es superior que cuando se utilizan microsegundos. Para evidenciar esta circunstancia, la figura anterior

se ha reconstruido (figura 4.5.6) representando el número de pulsos aplicado con ambos tipos de pulsos considerando la energía aplicada con cada pulso de una determinada intensidad del campo eléctrico (1 pulso de 1 milisegundo de 10 kV/vm libera 16 kJ/kg, frente a los 2 kJ/kg aplicados como 1 pulso de 3 microsegundos de 25 kV/cm), así como el tiempo de tratamiento aplicado expresado en milisegundos (figura 4.5.7). Si bien, debido a la mayor energía liberada por pulso de milisegundo, el número de pulsos a aplicar es menor que con microsegundos para aplicar el mismo nivel de energía, cuando se determina el tiempo de tratamiento, las diferencias entre aplicar milisegundos y microsegundos se hacen notables. Así, y como se observa en la figura, el tiempo a aplicar con los pulsos de milisegundos es entre 10 y 100 veces superior que en el caso de los microsegundos. Por ejemplo, para inactivar 1 ciclo logarítmico de *E. coli* O157:H7 en tampón de pH 3.5 a 20°C se hacen necesarios aplicar 100 kJ/kg con tratamientos de 4544 milisegundos (4.5 pulsos de 1000 microsegundos/pulso) de 11.6 kV/cm, o 343 microsegundos (115 pulsos de 3 microsegundos/pulso) de 17 kV/cm. Para 2 ciclos a 40 °C, los tratamientos serían de unos 250 kJ/kg aplicados con 21039 microsegundos (21 pulsos de 1000 microsegundos/pulso) de 9 kV/cm, o 395 microsegundos (132 pulsos de 3 microsegundos/pulso) de 25 kV/cm.

Si bien el tiempo de tratamiento es mucho más largo en el caso de los milisegundos, el menor número de pulsos y la menor intensidad del campo eléctrico a mayores temperaturas de procesado resultarían de gran interés a la hora de aplicarlos a nivel industrial ya que los equipos deberían tener menos potencia para generar numerosos pulsos de alta intensidad del campo eléctrico que como ya se ha indicado en la introducción, tienen una mayor dificultad técnica para diseñarse y, sobre todo, un mayor coste de los equipos. Sin embargo, se hace necesario evaluar en flujo continuo su potencial comparado de nuevo con la ya demostrada eficacia letal de pulsos de mayores intensidades del campo eléctrico y menores anchuras de pulso.



**Figura 4.5.5 a)** Combinaciones de energía específica y campo eléctrico a 20 y 40°C para inactivar 1 (líneas continuas) y 2 ciclos logarítmicos (líneas discontinuas), respectivamente, de *E. coli* O157:H7 aplicando pulsos de mili (en rojo) y microsegundos (en verde).

**b)** Combinaciones de energía específica y campo eléctrico a 20 y 40°C para inactivar 1 (líneas continuas) y 2 ciclos logarítmicos (líneas discontinuas), respectivamente, de *E. coli* O157:H7 aplicando pulsos de mili (en rojo) y microsegundos (en verde).

**c)** Combinaciones de energía específica y campo eléctrico a 20 y 40°C para inactivar 1 (líneas continuas) y 2 ciclos logarítmicos (líneas discontinuas), respectivamente, de *E. coli* O157:H7 aplicando pulsos de mili (en rojo) y microsegundos (en verde).

Pero quizás, el mayor inconveniente de la utilización de los milisegundos frente a los microsegundos es que los primeros pueden contribuir al desarrollo de especies químicas reactivas por fenómenos de electrolisis que se desarrollan cuando se aplican pulsos de anchura superior a los 20 microsegundos, además de producir el deterioro más rápido de los electrodo pudiéndose liberar partículas que pasen al alimento, incrementar la temperatura del medio de tratamiento, etc. (Sale y Hamilton, 1967; Sale y Hamilton, 1968; Mizuno y Hori, 1988; Lubicki y Jayaram, 1997; Ho y Mittal 2000). Si bien en esta investigación la temperatura del medio se ha controlado gracias al uso de una cámara termostatada en la que el máximo incremento de temperatura es de 4°C, no se ha investigado el desarrollo de las posibles reacciones de electrólisis o liberación de compuestos (en el desarrollo de este trabajo, se ha detectado una notable oxidación de

los electrodos de acero inoxidable utilizados al aplicar tratamientos de milisegundos, frente a la inexistente oxidación de los mismos al aplicar pulsos de microsegundos) que puedan estar afectando a la sensibilidad de los microorganismos a los PEAV y, por tanto enmascarando el efecto real de los tratamientos aplicados con milisegundos. Este es un aspecto que queda pendiente por investigar.

## 5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas tras la realización de este trabajo y estudio de los datos expuestos anteriormente se pueden resumir en las siguientes:

La inactivación obtenida con la aplicación de tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje en el orden de microsegundos y milisegundos varía dependiendo de la modulación de parámetros de procesado como la energía suministrada, la intensidad de campo eléctrico y la temperatura de tratamiento. Concretamente al aumentar la temperatura se consigue una mayor inactivación, al igual que en el caso de la intensidad de campo y energía. Sin embargo la temperatura posee un efecto mayor en la inactivación obtenida que el resto de parámetros, sobre todo al traspasar el umbral de 27°C y siendo más notable en el caso de los milisegundos.

En el caso del daño subletal, este es mayor cuanto menor es la intensidad de tratamiento, es decir, cuanto menor es la temperatura y el resto de parámetros de proceso. De nuevo, se detecta mayor daño subletal a temperaturas próximas a los 27°C independientemente de que se apliquen mili o microsegundos.

En cuanto a la eficacia letal de tratamientos PEAV aplicados con pulsos de mili o microsegundos, se puede concluir que la aplicación de tratamientos con pulsos eléctricos en el orden de milisegundos produjo una eficacia letal mayor que en el caso de los microsegundos para un mismo nivel energético aplicado cuando la temperatura del medio era superior a 27 °C. Por debajo de esta temperatura se ha confirmado lo descrito en la literatura: tratamientos de mayor intensidad y menor duración son más eficaces letalmente que los de baja intensidad y larga duración. En cualquier caso, la aplicación de tratamiento de milisegundo va a requerir tiempos de procesado más largos y la posibilidad de la generación de fenómenos de electrolisis que podrían afectar a la viabilidad de los microrganismos entre otros efectos

### **5.1. Conclusions**

These are the final conclusions of the current study:

The obtained inactivation with the application of pulsed electric fields treatment in the range of microseconds or milliseconds depended on the applied energy, the electric field intensity and the treatment temperature. An increment of the temperature, electric intensity field and the applied energy produced a higher inactivation. This effect was higher with the variation of the temperature ( $T^a > 27^\circ\text{C}$ ) and in the millisecond range.

Concerning the sublethal damage, this was higher when the treatment intensity was lower. Again this difference was more notable when the temperature was near  $27^\circ\text{C}$ , both in milli and microseconds

The lethal efficacy of the treatment in milliseconds was higher with temperatures greater than  $27^\circ\text{C}$ . Under that value the results confirmed the literature theories: treatments with higher intensity and lower duration are more lethal efficiently than treatments with lower intensity and higher duration. In any case the milliseconds treatments require longer processing times and, therefore, increases the probability of electrolysis problem that can affect the viability of microorganism.

## **6. Aportaciones de aprendizaje**

Con la realización de este proyecto he podido mejorar el desarrollo de algunas competencias transversales, las cuales 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 Pulso 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.

## **2. 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.

## **3. 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.

## **4. Asesoría legal, científica y técnica en el ámbito alimentario:**

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

## **5. 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.

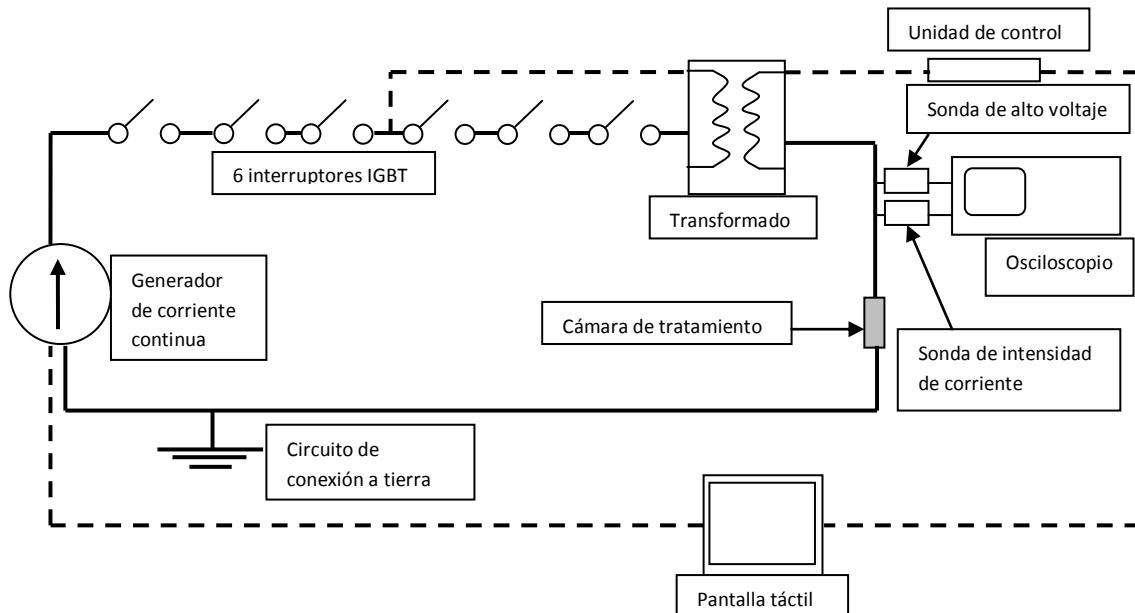
## **7. Bibliografía**

- Moody, A; Marx, G; Swanson, B; Bermúdez-Aguirre, D. 2013. A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food control*.
- Saldaña, G; Puertolas, E; López, N; García, D; Álvarez, I; Raso, J. 2008. 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.
- Gásková, D; Sigler, K; Janderová, B; Plásek, J. 1995. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 39:195-202

- Buckow, R; Chandry, S; Ng, S; McAuley, C; Swanson, B. G. 2013. Opportunities and challenges in pulsed electric field processing of dairy products. *International Dairy Journal*.
- McNamee, C; Noci, F; Cronin, D.A; Lyng, J.G; Morgan, D.J; Scannell, A.G.M. 2009. 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.
- Sampedro, F; McAlloon, A; Yee, W; Fan, X; Zhang, H.Q; Geveke, D.J. 2012. Cost analysis of commercial pasteurization of orange juice by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 17:72-78.
- Saldaña, G; Puértolas, E; Álvarez, I; Meneses, N; Knorr, D; 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
- 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.
- Gongora-Nieto, M. M.; Sepulveda, D. R.; Pedrow, P.; Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. 2002. Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 35:375-388.
- Wouters, Patrick C.; Alvarez, Ignacio; Raso, Javier. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. 2002. *Trends in Food Science & Technology*. 12:112-121
- Alvarez, I.; Pagán, R.; Condón, S; Raso, J. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. 2003. *International Journal of Food Microbiology*. 87:87-95.
- Huang, Kang; Wang, Jianping. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. 2009. *Journal of Food Engineering*. 95:227-239
- Saldaña, G.; Puértolas, E.; Álvarez, I.; Meneses, N.; Knorr, D.; Raso, J. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. 2010. *Journal of Food Engineering*. 100:349-356.
- Lubicki, P.; Jayaram, S. High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. 1997. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*. 43:135-141.

## ANEXO I

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.



**Figura 3.4** Configuración eléctrica del equipo de PEAV encargado de suministrar tratamiento en el orden de microsegundos.

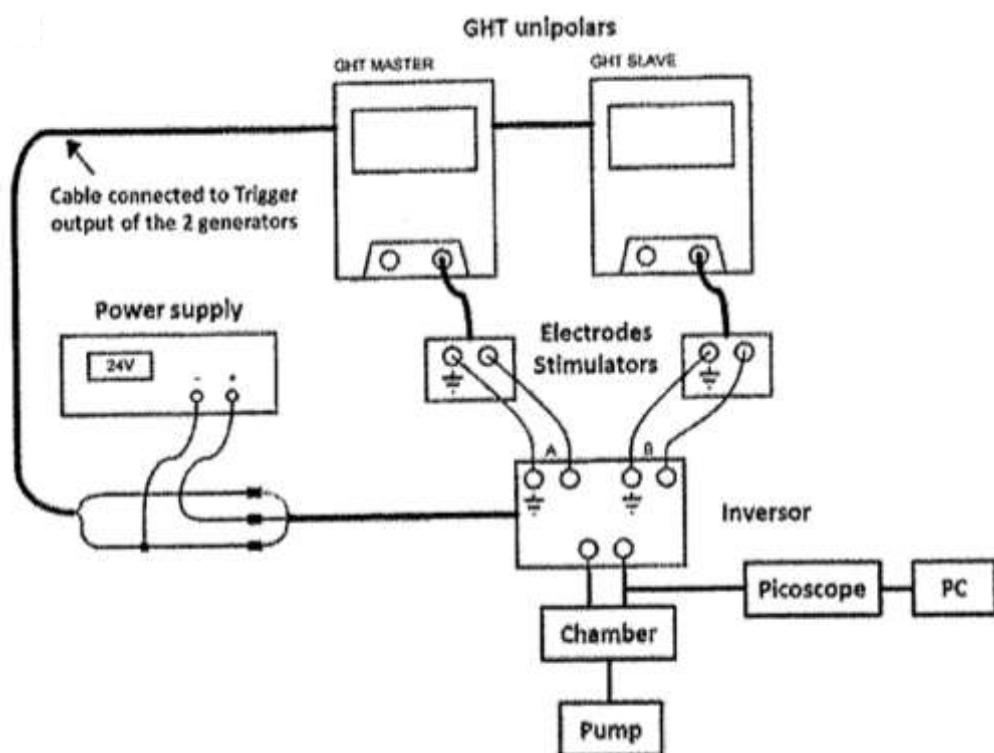
Una señal eléctrica externa controla la apertura y el cierre de seis interruptores IGBT (Switch rack SR-6, Scandinova). Los pulsos de onda cuadrada de un voltaje de 1kV generados por los interruptores se amplifican por un transformador en la señal de alto voltaje deseada. Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de  $3\mu\text{s}$  de duración, de hasta 30kV de voltaje y 200A de intensidad, a una frecuencia de hasta 200Hz.

El equipo está diseñado para trabajar en condiciones óptimas con una resistencia en la cámara de tratamiento de entre 100 y 170  $\Omega$ . En estas condiciones, se consigue un pulso cuadrado en el que el voltaje aumenta hasta el valor establecido a una velocidad de  $47 \text{ kV}/\mu\text{s}$ , y una vez transcurridos los  $3 \mu\text{s}$  la velocidad de caída es de  $56 \text{ kV}/\mu\text{s}$ . Sin embargo, cuando la resistencia de la cámara es menor de  $100 \Omega$  o mayor de  $170 \Omega$  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 enfriá 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.

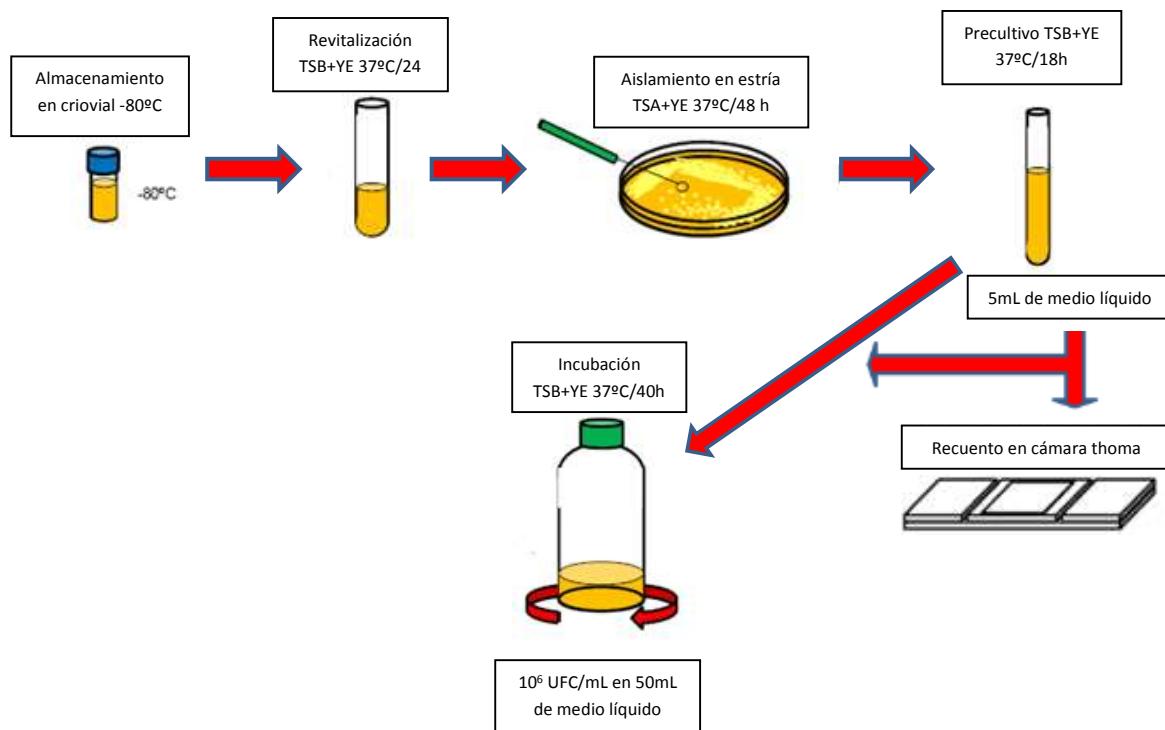
Para conocer y registrar el voltaje y la intensidad de corriente realmente aplicados, y así conocer las condiciones reales de tratamiento, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix, Wilsonville, Oregon, EE.UU.) y otra de intensidad de corriente (Stangenes Industries, Palo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

A continuación (figura 3.5) se muestra la configuración eléctrica del equipo de PEAV encargado de suministrar los tratamientos en el orden de milisegundos. En este dos generadores de pulsos S20 producen, sucesivamente, pulsos similares con una diferencia de tiempo controlada. Esto es posible gracias a la utilización de un inversor que invierte la polaridad del segundo pulso con el objetivo de obtener pulsos simétricos.

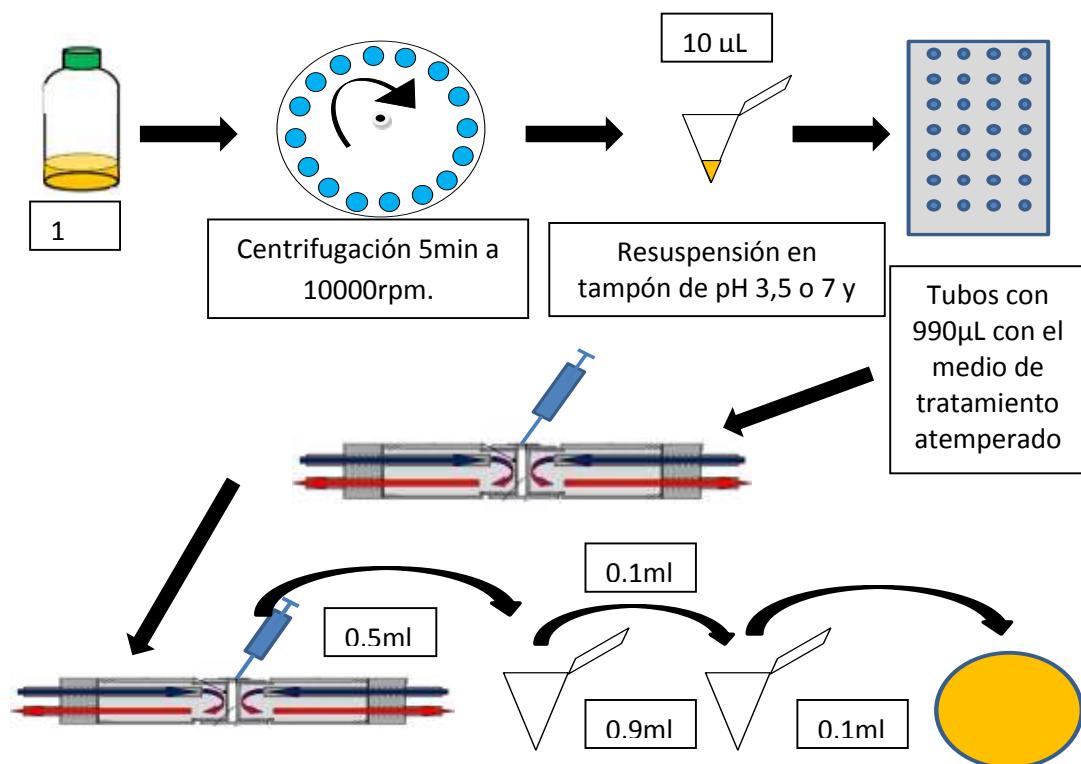


**Figura 3.5** Configuración eléctrica del equipo de PEAV encargado de suministrar tratamiento en el orden de milisegundos. (Coustets et al., 2013)

## ANEXO II



**Figura 3.1.** Esquema del procedimiento para la obtención de las suspensiones microbianas.



**Figura 3.7.** Esquema de preparación de las muestras al tratamiento por PEAV (Saldaña, 2012).