

Alma Mater Studiorum - **UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**
CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

**SOPRAVVIVENZA DEI MICROORGANISMI
AI TRATTAMENTI NON TERMICI: IL CASO
DEI CAMPI ELETTRICI PULSATI (PEF)**

Relazione finale in

**MICROBIOLOGIA ALIMENTARE (c.i. MICROBIOLOGIA DEGLI
ALIMENTI)**

Relatore:

Prof. Andrea Gianotti

Presentata da:

Noemi Mottola

Correlatore

Dott. Lorenzo Nissen

Sessione II

Anno Accademico 2017/2018

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 2: CONSIDERAZIONI SUGLI ASPETTI TECNOLOGICI DELLA PEF	9
2.1 Utilizzo dei campi elettromagnetici	9
2.2 Campi elettrici pulsati (PEF)	13
2.2.1 Meccanismo di elettropermeabilizzazione	14
2.2.2 Impatto del trattamento PEF moderato sui composti bioattivi negli alimenti	16
CAPITOLO 3: EFFETTI SUB-LETALI DELLA PEF SULLE CELLULE MICROBICHE	23
3.1 Premessa	23
3.2 Effetti sub-letali della PEF su diversi tipi di microrganismi	25
3.3 Fattori che influenzano la resistenza delle cellule microbiche	27
3.4 Meccanismi di protezione e cambiamenti metabolici nelle cellule danneggiate sub-letalmente	30
3.5 Miglioramento dell'efficacia della PEF	32
3.5.1 Regolazione della temperatura	32
3.5.2 Aggiunta di costituenti antimicrobici	33
3.5.3 Regolazione del pH	33
3.5.4 Combinazione con i metodi fisici	34
CAPITOLI 4: ANALISI COMPARATIVA DEGLI EFFETTI DELLA PEF IN CONFRONTO AD ALTRE TECNOLOGIE NON TERMICHE	35
4.1 Premessa	35
4.2 Resistenza comparativa dei patogeni alimentari a MS, PEF, HHP, e UV	38
4.2.1 Influenza dello stato fisiologico e condizioni culturali delle cellule del microrganismo sulla resistenza a MF, PEF, HHP e UV	44
4.2.2 Fattori che agiscono durante il trattamento	48
4.2.2.1 Proprietà del mezzo	48
4.2.2.2 Fattori di processo	54
4.2.3 Fattori che agiscono dopo il trattamento	56
4.3 Considerazioni finali	59

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Al giorno d'oggi, sempre più consumatori chiedono prodotti alimentari di alta qualità, con sapori, gusti e aspetto naturali, freschi, e con pochi processi di lavorazione, giusto quelli necessari per ottenere questi risultati (Bisconsin Junior *et al.*, 2015; Oey *et al.*, 2008). Allo stesso tempo, c'è maggiore preoccupazione riguardo segnalazioni di “falle” nei sistemi di sicurezza alimentare che determinano contaminazione etmicrobica, con conseguente aumento del costo di produzione a causa di non conformità, auditing e attività regolatorie.

Gli alimenti più comunemente implicati in questi focolai microbici includono: pasta, uova fresche, prodotti a base di uova, dessert, acqua, frutti di mare, alimenti *ready to eat*, carni crude e lavorate e latticini (Gomes *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2011; Van Doren *et al.*, 2013). La maggior parte di tali contaminazioni microbiche, è dovuta in particolare alla *Salmonella spp.*, seguita da *Escherichia coli (E. coli)*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella spp.*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* e altri (Araújo *et al.*, 2002; Frozi *et al.*, 2015; Soliman e Aly, 2011).

La sicurezza alimentare è diventata uno dei concetti cardine che sta guidando gli sviluppi nella moderna industria alimentare per garantire ai consumatori prodotti alimentari sani. Proprio con questo obiettivo, diverse tecnologie, hanno lo scopo di eliminare definitivamente i microrganismi o almeno di inibirne e rallentarne la crescita nei prodotti alimentari. I metodi convenzionali di controllo microbico, dipendono principalmente dalle basse e dalle alte temperature, e anche dai conservanti chimici; il loro effetto dipende dai tempi di trattamento, i quali dipendono strettamente dalle proprietà fisiche e chimiche dell'alimento. Ad esempio, nei trattamenti termici come la pastorizzazione, i prodotti alimentari sono esposti a temperature che variano dai 60°C a oltre i 100°C per tempi che vanno dai pochi secondi a pochi minuti, in base al prodotto che si sta trattando, e in base al risultato che vogliamo ottenere (Bornhorst *et al.*, 2017; Jay, 1998).

Il risultato che solitamente desideriamo, è una riduzione del carico microbico che garantisca sicurezza e stabilità del prodotto per un lungo periodo di tempo. Sebbene lo scopo di questa energia è quello di distruggere i microrganismi e quindi salvaguardare i prodotti alimentari dal deterioramento, l'energia erogata potrebbe innescare delle reazioni indesiderate che potrebbero portare a numerosi cambiamenti non graditi, compresa la perdita sia delle sostanze nutritive che delle caratteristiche organolettiche (Boye e Arcand, 2013; Ortega-Rivas, 2012; Pasha *et al.*, 2014).

Anche le tecniche di raffreddamento e congelamento possono influenzare la contaminazione microbica, ma solitamente senza che vi sia una vera e propria sanitizzazione, perché come sappiamo, con le basse temperature i microrganismi non muoiono, semplicemente rallentano il loro sviluppo, o al massimo bloccano la loro attività in attesa che aumentino le temperature. I trattamenti termici, hanno avuto molto successo sul controllo dei microrganismi in campo alimentare. Tuttavia, hanno importanti svantaggi legati alla freschezza e alla qualità nutrizionale. Inoltre, tali trattamenti, richiedono alti quantitativi di energia che portano ad un aumento dei costi di produzione.

Negli ultimi anni si sono sviluppati dei metodi alternativi per inattivare i microrganismi, senza l'utilizzo del calore, come:

- l'uso dell'alta pressione idrostatica (HHP) (Fernandes *et al.*, 2017; Yamamoto, 2017)
- campo elettrico pulsato (PEF) (Zhang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017)
- campi magnetici oscillanti (OMF) (Otero *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2017)
- ultrasuoni (Gomes *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)
- luce pulsata (Escott *et al.*, 2017; Proulx *et al.*, 2017)
- trattamento della superficie con plasma (Hertwig *et al.*, 2015; Sen e Mutlu, 2013)
- CO₂ ad alta pressione (Rao *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016)
- irraggiamento a fascio di elettroni (Benbettaieb *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017).

Questi metodi cosiddetti “non termici”, sono stati messi a punto per inattivare efficacemente i microrganismi e per prolungare la shelf-life del prodotto pur mantenendone la freschezza e la qualità fisica, nutrizionale e sensoriale (Saidatul, *et al.*, 2013). La tecnologia PEF è stata ampiamente studiata per la pastorizzazione degli alimenti e per la loro conservazione, per la sua efficace attività di inattivazione dei microrganismi patogeni, e non solo (Barba *et al.*, 2015; Kotnik and Miklavcic, 2006; Lebovka and Vorobiev, 2009; Mahnic-Kalamiza and Vorobiev, 2014; Marsellesfontanet *et al.*, 2009; Toepfl, 2012; Toepfl *et al.*, 2005, 2014a, 2014b)

La tecnologia PEF è caratterizzata da un'intensità di campo elettrico che varia da 20 a 250kV/cm, in brevi periodi di tempo, ha il potenziale per pastorizzare un liquido alimentare a temperature inferiori a 30-40°C, temperature molto inferiori, rispetto alle temperature utilizzate nei trattamenti termici (Beebe *et al.*, 2003; Pena *et al.*, 2011). Gli effetti della PEF dipendono principalmente dalla forza del campo elettrico. Ad esempio, a livelli di intensità inferiori, il trattamento PEF è uno strumento efficace per aumentare l'efficienza di asciugatura e migliorare la resa di estrazione di alcuni materiali intracellulari. Aguilo-Aguayo *et al.* (2015), hanno utilizzato la metodologia della superficie di risposta (RSM) per determinare le condizioni ottimali per estrarre molecole bioattive: il campo elettrico di resistenza (1 e 4kV / cm), il numero di impulsi (100 e 1500), la frequenza degli impulsi (10 e 200Hz) e la larghezza dell'impulso (10 e 30ms) che potrebbero massimizzare l'estrazione di poliacetilene da fette di carota. A maggiori intensità di campo, la permeabilizzazione osservata delle cellule esposte a PEF, può essere usata anche come un meccanismo per il trasferimento di geni, o estrazione dei metaboliti dall'interno delle membrane. Forze di campo elettrico ancora più elevate (10 e 80kV / cm), vengono utilizzate per la pastorizzazione, perché le membrane microbiche vengono disgregate a tal punto che le cellule non sono più in grado di ripararle, e di conseguenza muoiono (Bansal *et al.*, 2015). In pratica, la PEF impiega generalmente campi elettrici superiori a 25kV / cm per inibire la crescita microbica (Toepfl *et al.*, 2007), questo perché c'è la possibilità che una percentuale significativa di cellule, possa sopravvivere all'esposizione a questo tipo di trattamento, se

mantenuto nell'intervallo 10 e 19kV / cm (H.M. Ulmer *et al.*, 2002). La tecnologia PEF, ha però alcune limitazioni. Ad esempio, qualsiasi tipo di spore batteriche o ascospore di muffe presenti nei prodotti alimentari sono di solito resistenti al trattamento PEF, anche ad alta intensità. Questa proprietà potrebbe portare ad un fallimento del processo di pastorizzazione, con un conseguente potenziale rischio per la sicurezza alimentare (Arroyo *et al.*, 2012). Inoltre, in determinate condizioni, anche le cellule vegetative sono resistenti al trattamento con PEF. Ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato che alcuni ceppi microbici, appartenenti a *Staphylococcus aureus*, *E.coli* e *Salmonella typhimurium*, possono tollerare la PEF (Zhao *et al.*, 2013).

Al fine di garantire il trattamento della PEF, Saldana *et al.* (2009), ha concluso che è importante conoscere la maggior parte dei microrganismi presenti che sono resistenti ad essa, prima di applicarla, come ad esempio la *Listeria monocytogenes*. Ad esempio, Zhao *et al.* (2011), ha quantificato il danno indotto dalla PEF sulle cellule microbiche in un tampone fosfato sterile (10mM, pH 7,0), utilizzando il metodo della citometria a flusso (FCM), in combinazione con tecniche di colorazione fluorescente. Tali autori hanno scoperto che la proporzione delle cellule danneggiate in modo sub-letale (SIC), ha raggiunto un massimo dopo 50 impulsi a 12,0kV /cm per *Saccharomyces cerevisiae* e 16,5kV / cm per *Dekkera bruxellensis*. Nell'ultimo decennio, è stata prestata maggiore attenzione alle proprietà delle SIC immediatamente dopo il trattamento con PEF, e durante il successivo processo di recupero (Saldana *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016b, 2016c). La maggior parte di questi studi sono stati condotti nell'industria alimentare o in campo biomedico, e una grande percentuale di essi, si è concentrata sul miglioramento della sicurezza microbiologica o sull'estrazione selettiva di molecole bioattive, in combinazione con altri metodi (Koubaa *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Postma *et al.*, 2016). Di recente la PEF è stata testata su vari campi, e ha avuto degli ottimi risultati. (Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2016). In questa tesi sono trattati gli effetti della PEF sulla sopravvivenza dei microrganismi negli alimenti. In particolare, si è voluto, sia dare una panoramica dei risultati raggiunti, che descriverne criticità e potenzialità future

anche in comparazione con altre tecnologie cosiddette “non termiche”. In particolare verranno approfonditi alcuni aspetti riguardanti:

- Aspetti tecnologici della PEF
- effetti letali della PEF sulle cellule microbiche
- effetto sub-letale sulle cellule e meccanismo di azione
- come migliorare il processo di pastorizzazione combinando la PEF con altri processi

CAPITOLO 2

CONSIDERAZIONI SUGLI ASPETTI TECNOLOGICI DELLA PEF

2.1 Utilizzo di campi elettromagnetici

La qualità e la sicurezza degli alimenti, sono questioni importanti sia per i consumatori che per l'industria alimentare. Nell'industria alimentare, l'abbattimento dei microorganismi viene principalmente raggiunto applicando temperature elevate (vale a dire tramite un processo termico).

Tuttavia, i processi non termici, sono stati studiati e applicati nell'industria alimentare per ottenere la sterilità commerciale. Nonostante questo, le tecnologie convenzionali di sterilizzazione termica provocano cambiamenti negativi nel valore nutrizionale, nel sapore, nel colore o nella struttura del prodotto finale, o formano sottoprodotti indesiderati, che influenzano la qualità e la sicurezza degli alimenti (Li & Farid, 2016; Pereira & Vicente, 2010). La crescente consapevolezza del cibo e della salute porta i consumatori a preferire cibi più naturali e minimamente trasformati. Pertanto, nell'ultimo decennio, le tecnologie di trattamento non termiche, hanno attirato l'attenzione di scienziati del settore alimentare, tecnici e ingegneri del mondo accademico e dell'industria alimentare.

Oggi giorno, ci sono un certo numero di tecniche di elaborazione non termiche disponibili, che tuttavia si trovano in varie fasi di ricerca e sviluppo. Tra queste, le tecniche basate sui campi elettromagnetici sono state ampiamente

studiate e applicate. Includono campi elettrici pulsati (PEF), scarica ad arco ad alta tensione (HVAD), luce pulsata (PL), microonde, irraggiamento e plasma freddo (CP). Le tecniche non termoelettriche, basate su campi elettromagnetici, generalmente hanno il vantaggio di avere un impatto minimo sulle proprietà nutrizionali e sensoriali degli alimenti, e prolungano la shelf-life del prodotto, inibendo o distruggendo i microrganismi (Chen, Yu, & Rupasinghe, 2013; Zhang, Barbosa-Canovas, Dunne, Farkas e Yuan, 2011). Tiwari, O'Donnell e Cullen (2009), hanno scoperto che le tecnologie non termiche, PEF e irraggiamento, hanno un'influenza minima sul contenuto di antocianine nei succhi di frutta. Rosello-Soto *et al.* (2015), hanno dimostrato che quando l'energia assorbita viene aumentata, l'applicazione di scariche elettriche ad alta tensione potrebbe aumentare significativamente le estrazioni acquose e idro-etanoliche del contenuto fenolico totale.

Inoltre, l'efficienza di inattivazione dei microrganismi, mediante tecniche di trattamento non termiche, basate su campi elettromagnetici è eccellente (Geveke, 2008). Ad esempio, Gayan, Serrano, Raso, Alvarez e Cond (2012), hanno dimostrato che la combinazione di luce UV e temperature limitate, potrebbe raggiungere una riduzione del 99,99% (4D) di *Salmonella enterica subsp. Enterica*. Queste tecnologie hanno una caratteristica in comune: i prodotti alimentari non vengono riscaldati, il che significa che la temperatura viene generalmente mantenuta a temperature basse o moderate (ad esempio inferiori a 60°C). Tuttavia, alcuni meccanismi di inattivazione, non sono ancora completamente compresi.

La discussione sui meccanismi, si concentra principalmente sul cambiamento della morfologia e della struttura cellulare, sulla passivazione endogena degli enzimi chiave del metabolismo cellulare, sul danno al DNA del materiale genetico cellulare e sul cambiamento nell'espressione genica. Inoltre, a causa della necessità di attrezzature costose e specializzate e di competenze con esperienza, queste tecnologie sono spesso tecnicamente difficili per le loro applicazioni dirette nella produzione di alimenti (Pereira e Vicente, 2010, Stoica *et al.*, 2013). Al fine di fornire ulteriori informazioni sul progresso tecnologico di queste tecniche di trattamento non ambientali, e

promuovere il loro ulteriore studio e applicazione, Yuanyuan Pan *et al.* (2017) hanno preso in rassegna le principali prospettive di campi elettrici pulsati (PEF), scarica ad arco ad alta tensione (HVAD), luce pulsata (PL), radiazioni ionizzanti, microonde e plasma freddo (CP). In particolare tali Autori hanno riassunto il loro meccanismo di inattivazione, caratteristiche e limiti. La tabella 2.1., mostra il confronto di questi trattamenti non termici.

Tabella 2.1. - Confronto e sintesi dei trattamenti non termici. Yuanyuan Pan *et al.*, (2017)

Technology	Advantages	Limitations and Challenge	Future research	References
PEF	Save energy; especially applicable in liquid food and extraction; does not leave toxic residuals	The limited inactivation efficiency of spores; textural changes; the commercial scale treatment system in food industry are still not widely used; evaluation of process efficiency for the different application possibilities	Extending to a number of products, not only liquids; combining with thermal treatment.	Jaeger <i>et al.</i> (2009) and Li and Farid (2016)
HVAD	Low energy consumption and high energy utilization rate	Possibility of causing contamination of treated foods; not large scale application	Encouraging the development of new generators with high voltage output; as a green extraction technique.	Boussetta and Vorobiev (2014) and Rosello-Soto <i>et al.</i> (2015)
PL	Rapid disinfection; less damage to nutrient content and less residual of applied chemical disinfectants	Limited efficiency for controlling food heating; the penetration of the UV component is extremely low	PL has considerable potential to be implemented in the transparent liquid food industry and surface treatments of less transparent materials.	Elmnasser <i>et al.</i> (2007) and Gomez-Lopez, Ragaert, Debevere, and Devlieghere (2007)
Ionizing Radiation	Less processing time; processing in packaged products and	Possibility of inducing undesirable	Informing the public to have better understanding	Farkas and Mohacsi-Farkas (2011) Farkas <i>et al.</i>

	hence avoid recontamination; eco-friendly without chemicals and residues generated	chemical changes; relatively low penetration depth; inactivation of spores needs high doses which are not permitted for commercial applications currently; still relatively underutilized commercially and is not appreciated by consumers	of the role of the technologies in controlling food-borne pathogens.	(2014) and Tahergorabi <i>et al.</i> (2012)
Microwave	Less processing time	The mechanism and proof of nonthermal effects are still at pilot scale and have not been proven conclusive	Detailed investigations and experimentation are required to more fully understand the mechanisms.	George <i>et al.</i> (2008) and Huang <i>et al.</i> (2009)
CP	Can be used at low temperatures; does not leave toxic residuals; can be used for in-package sterilization;	Effects of CP treatment on food sensory and nutritional quality as well as possible toxic compound formation of the treated foods are largely unexplored	More studies on in-package; combining the CP treatment with other nonthermal processes could be a possible future breakthrough	Kim <i>et al.</i> (2015); Misra <i>et al.</i> (2014a) and Misra <i>et al.</i> (2011)

2.2 Campi elettrici pulsati PEF

La tecnologia PEF consiste nella somministrazione di brevi impulsi elettrici ad alta potenza, su un prodotto posizionato in una camera di trattamento, confinata tra gli elettrodi. I sistemi tipici per il trattamento di fluidi pompabili, sono costituiti da un'unità di generazione PEF, che a sua volta è composta da un generatore di alta tensione e un generatore di impulsi, una camera di trattamento, un idoneo sistema di gestione del prodotto e una serie di dispositivi di monitoraggio e controllo (Figura 2.1)

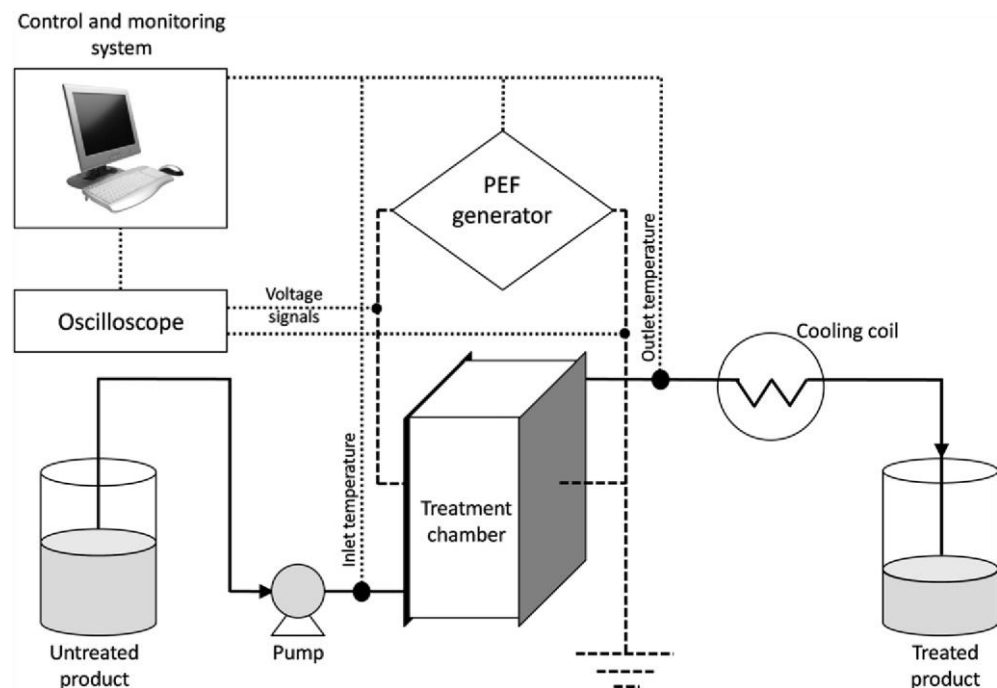


Figura 2.1 - Schemi di un sistema di elaborazione PEF per prodotti pompabili. (Robert Soliva-Fortuny et al., 2009).

L'effetto permeabilizzante sulle membrane biologiche derivante dall'applicazione di correnti elettriche alternate pulsate, è noto dall'inizio del XX secolo, ma solo durante gli anni '90, è stata condotta una ricerca approfondita su questa tecnologia. Da un lato, la maggior parte degli studi sui trattamenti ad alta intensità è stata dedicata alla progettazione di applicazioni di pastorizzazione per prodotti liquidi, al fine di raggiungere i livelli appropriati di morte microbica e di produrre un impatto sull'attività enzimatica; d'altro canto, i trattamenti di intensità lieve o moderata sono attualmente in fase di studio per sfruttare il loro potenziale di permeabilizzare strutture tissutali, consentendo

così l'implementazione nel contesto di operazioni già esistenti come l'estrazione o l'essiccazione. Inoltre, la PEF può anche fornire un potenziale per indurre reazioni di stress in sistemi vegetali o colture cellulari, in modo da indurre il miglioramento e la stimolazione della bio-produzione di alcuni composti (Toepfl, Mathys, Heinz e Knorr, 2006).

L'interesse crescente dei consumatori per i prodotti alimentari nutrienti e ad alto contenuto nutritivo, insieme alla ricerca di tecnologie di trattamento rispettose dell'ambiente, ha aiutato lo sviluppo di tecnologie emergenti non termiche come la PEF. Tuttavia si sa ancora poco sugli effetti dei trattamenti PEF sui composti bioattivi negli alimenti. Studi sperimentali, suggeriscono che i trattamenti PEF possono essere un modo concreto per assicurare un effetto pastorizzante senza influenzare sostanzialmente la composizione nutrizionale dei prodotti alimentari.

Di seguito, viene riportato uno stato dell'arte della tecnologia PEF

2.2.1 Meccanismo di elettropermeabilizzazione

L'applicazione di un campo elettrico esterno su cellule biologiche (animali, piante o microbiche), provoca un danno sulla membrana cellulare. Fino ad oggi sono stati suggeriti un numero di modelli teorici, ma non esiste ancora una chiara evidenza del meccanismo d'azione a livello cellulare. La teoria più accettata, è il modello elettromeccanico introdotto da Zimmerman, Pilwat e Riemann (1974), il quale considera la membrana cellulare un condensatore con una costante dielettrica bassa. Cariche libere di polarità opposte sono presenti su entrambi i lati di una membrana (interna ed esterna), determinando un potenziale transmembrana naturale. L'esposizione a un campo elettrico induce accumulo di cariche interne ed esterne della cella attraverso la membrana, e quindi un aumento del potenziale transmembrana.

Un ulteriore potenziale indotto dal campo elettrico esterno, aumenta la forza di compressione sulla membrana a causa dell'attrazione tra le cariche opposte su entrambi i lati della membrana, che induce contemporaneamente l'assottigliamento della membrana. L'attrazione elettrostatica tra i due lati di una membrana, è ulteriormente aumentata a causa del diradamento di una

membrana. Quando l'elettro-compressione supera la resistenza elastica, si verifica una rottura locale della membrana con formazione di pori, in un range al di sotto del microsecondo ad un dato valore di campo applicato.

La formazione dei pori, è un processo dinamico e può essere reversibile o irreversibile a seconda dell'intensità del trattamento. Quando i pori indotti sono piccoli rispetto all'area della membrana e sono generati con un trattamento PEF a bassa intensità, l'effetto è invece reversibile (Angersbach, Heinz e Knorr, 2000). La vitalità della cellula viene mantenuta e la conseguente biosintesi dei metaboliti secondari può essere attivata come risposta alla condizione di stress indotta dal trattamento con PEF. L'aumento dell'intensità del trattamento, aumentando la forza del campo elettrico e / o il tempo di trattamento (che considera il numero di impulsi e l'ampiezza dell'impulso applicati in un sistema discontinuo) promuoverà la formazione di pori dilatati e la permeabilità reversibile si trasformerà in una rottura irreversibile. La forza critica del campo elettrico per indurre la permeabilizzazione della membrana, dipende dalla geometria e dalle dimensioni della cella, nell'intervallo di 1 e 2kV / cm per le cellule vegetali (dimensione delle cellule 40e200 μ m) e nell'intervallo di 12 e 20kV / cm per i microrganismi (dimensione delle cellule 1e10 μ m) (Heinz, Alvarez, Anger- sbach, & Knorr, 2002).

Sulla base di questo fenomeno, l'elettroporazione (permeabilizzazione della membrana cellulare causata dal campo elettrico esterno), è stata studiata in applicazioni pratiche su vari sistemi biologici nel campo della medicina e della biologia. Sebbene solo recentemente l'uso di intensità di campo moderata sia stato preso in considerazione nelle scienze alimentari, la maggior parte degli studi sono stati condotti nell'ambito della permeabilizzazione irreversibile della membrana, con l'obiettivo principale di indurre l'inattivazione microbica o facilitare l'estrazione di componenti specifici e / o aumentare l'efficienza dell'essiccazione.

2.2.2 Impatto del trattamento PEF moderato sui composti bioattivi negli alimenti

L'applicazione della tecnologia PEF nella trasformazione degli alimenti, ha suscitato grande interesse negli ultimi due decenni, non solo come una nuova tecnologia di conservazione non termica, ma perché offre una serie di altre utili applicazioni nell'industria alimentare. Miglioramento dell'estrazione di metaboliti intracellulare (Ade-Omowaye, Angersbach, Eshtiaghi, & Knorr, 2001; Fincan, DeVito, & Dejmek, 2004; Geulen, Teichgraeber & Knorr, 1994; Tedjo, Eshtiaghi, & Knorr, 2002), miglioramento dell'efficienza di essiccamento (AdeOmowaye *et al.*, 2001; Taiwo, Angersbach, & Knorr, 2002), modifica dell'attività enzimatica (Giner, RauretArino, Barbosa-Canovas, e Martin-Belloso, 1997; Yoem, Streaker, Zhang, & Min, 2000) , conservazione di alcuni ingredienti alimentari (Jia, Zhang e Min, 1999) e produzione di metaboliti secondari inducendo reazioni di stress nei sistemi vegetali (Balasa, Toepfl, & Knorr, 2006; Guderjan, Toepfl, Angersbach e Knorr, 2005) e colture cellulari (Do`rnenburg e Knorr, 1993), sono in fase di studio. Fino ad ora, sono state condotte numerose sperimentazioni per dimostrare che il processo della PEF, potrebbe inattivare rapidamente i microrganismi negli alimenti, specialmente in quelli liquidi.

I microrganismi che possono essere inattivati dalla PEF, includono cellule vegetative, muffe e lieviti, mentre le spore batteriche sono resistenti al trattamento con PEF e i lieviti sono i microrganismi più sensibili alla PEF (Kuldiloke & Eshtiaghi, 2008).

La Tabella 2 riassume gli effetti dei trattamenti PEF sull'inattivazione di agenti patogeni presenti negli alimenti liquidi. Tra gli studi elencati nella Tabella 2, Walkling-Ribeiro *et al.* (2008), hanno riscontrato che il succo di mela trattato con PEF (40kV cm1, 100ms, ingresso della camera a 46°C e uscita a 58°C) presentava una riduzione più elevata ($p < 0,05$) di *S. aureus* rispetto alla pastorizzazione convenzionale (9,5 vs 8.2 log10, rispettivamente). Inoltre, Altuntas, Evrendilek, Sangun e Zhang (2010,) hanno dimostrato che l'inattivazione di *Escherichia coli O157: H7*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* erano significativamente migliorate con l'aumento della forza

del campo elettrico e del tempo di trattamento (p 0.05) (Figura 2.2 e Tabella 2.2).

Tabella 2.2 -Gli effetti dei trattamenti PEF sull'inattivazione degli agenti patogeni presenti negli alimenti in alimenti liquidi. (Y. Pan *et al.*, 2017).

Microorganism	Food	Treatment conditions	Salient results	References
E. coli	Liquid egg yolk	E = 30 kV cm ⁻¹ ; T ¼ 40 C	The populations of E. coli O157:H7 reduced by 5 log ₁₀ .	Amiali, Ngadi, Smith, and Raghavan (2007)
	Orange juice	E = 40 kV cm ⁻¹ ; t¼ 100 ms; T ¼ 56 C	PEF caused a significant decrease (p < 0.05) in the viability of E. coli k12 achieving reductions of 6.3 log ₁₀ .	McNamee <i>et al.</i> (2010)
	Green tea beverage	E = 38.4 kV cm ⁻¹ ; t¼ 160 ms	The populations of E. coli reduced by 5.6 log ₁₀ .	Zhao <i>et al.</i> (2008)
	Melon juice	E = 35 kV cm ⁻¹ ; t¼ 1440 ms; f ¼ 217 Hz; T 40 C	The populations of E. coli reduced by 3.71 ± 0.17 log ₁₀	Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, and Martin-Belloso (2007)
	Watermelon juice	E = 35 kV cm ⁻¹ ; t¼ 1727 ms; f ¼ 188 Hz; T 40 C	The populations of E. coli reduced by 3.6 ± 0.4 log ₁₀	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2007)
	Formulated carrot juice	E = 32.89 kV cm ⁻¹ ; t¼ 30 ms	The populations of E. coli O157:H7 reduced by 3.57 ± 0.32 log ₁₀	Akin and Evrendilek (2009)
	Fruit juices	E = 35 kV cm ⁻¹ ; 4 ms pulse length in bipolar mode; T 40 C	The populations of E. coli O157:H7 reduced by more than 5.0 log ₁₀ units if treated only by HIPE.	Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, and Martín-Belloso (2008)
	Sour cherry juice Tropical fruit smoothie	E = 0 (control), 17, 20, 23, 27, and 30 kV cm ⁻¹ , 50 mL min ⁻¹	Inactivation of E. coli O157:H7 was significantly flow rate, 3 ms pulse duration, 500 pps repetition rate, and increased with increased electric field strength t¼ 131 ms; E = 17 kV cm ⁻¹ , 3 ms pulse duration, 50 mL min ⁻¹ and treatment time	Altuntas <i>et al.</i> (2010) Walkling-Ribeiro <i>et al.</i> (2008)

		(p 0.05) flow rate, t¼ 0 (control), 66, 105, 131, 157 and 210 ms E = 34 kV cm ¹ ; preheating T ¼ 55 C; t¼ 100 ms The populations of E. coli O157:H K 12 reduced by 5.2 log ₁₀ .	
S. aureus	Apple juice	E = 40 kV cm ¹ ; t¼ 100 ms; T ¼ 46 C (PEF inlet) and 58 C (PEF A significant reduction (p < 0.05) of S. aureus outlet) was achieved.	Walkling-Ribeiro <i>et al.</i> (2008)
	Liquid whole egg	E = 40 kV cm ¹ ; t¼ 15 ms The populations of S. aureus reduced by 3 log ₁₀ .	Monfort <i>et al.</i> (2010)
	Green tea beverage	E = 38.4 kV cm ¹ ; t¼ 200 ms	Zhao <i>et al.</i> (2008)
	Sour cherry juice	The populations of S. aureus reduced by 3.9 log ₁₀ .	Altuntas <i>et al.</i> (2010)
	Orange juice	E = 0 (control), 17, 20, 23, 27, and 30 kV cm ¹ , 50 mL min ¹ Inactivation of S. aureus was significantly flow rate, 3 ms pulse duration, 500 pps repetition rate, and increased with increased electric field strength t¼ 131 ms; E = 17 kV cm ¹ , 3 ms pulse duration, 50 mL min ¹ and treatment time (p 0.05) flow rate, t¼ 0 (control), 66, 105, 131, 157 and 210 ms E = 40 kV cm ¹ ; t¼ 150 ms The populations of S. aureus reduced by 5.5 log ₁₀ .	Walkling-Ribeiro <i>et al.</i> (2009)
	Orange juice	E = 40 kV cm ¹ ; t¼ 150 ms; and combine with thermosonication for 10 min at 55 C	The populations of S. aureus reduced by 6.8 log ₁₀ . Walkling-Ribeiro <i>et al.</i> (2009)
L. innocua	Orange juice	E = 40 kV cm ¹ ; t¼ 100 ms; T ¼ 56 C	PEF caused a significant decrease (p < 0.05) in the viability of L. innocua achieving reductions of 3.7 log ₁₀ . McNamee <i>et al.</i> (2010)
	Milk	E = 40 kV cm ¹ ; t¼ 50 ms; T ¼ 10 C	The populations of Listeria innocua Noci, Walkling-Ribeiro, Cronin, Morgan, and

			reduced by 3.3 log ₁₀ .	Lyng (2009)
	Skim milk	E = 31 kV cm ⁻¹ ; t _{1/4} 2 ms; T ¼ 56 C	The populations of <i>Listeria innocua</i> reduced by 6 log ₁₀ .	Sepulveda, Gongora-Nieto, San-Martin, and Barbosa-Canovas (2005)
	Skim milk	E = 31 kV cm ⁻¹ ; t _{1/4} 2 ms; T ¼ 56 C	The populations of <i>Listeria innocua</i> reduced by 6 log ₁₀ .	Sepulveda <i>et al.</i> (2005)
L. monocytogenes Melon juice		E = 35 kV cm ⁻¹ ; t _{1/4} 1440 ms; f ¼ 217 Hz; T 40 C	The populations of <i>L. monocytogenes</i> reduced by 3.56 ± 0.26 log ₁₀	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2007)
	Watermelon juice	E = 35 kV cm ⁻¹ ; t _{1/4} 1727 ms; f ¼ 188 Hz; T 40 C	The populations of <i>L. monocytogenes</i> reduced by 3.41 ± 0.13 log ₁₀	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2007)
	Sour cherry juice Beverage	E = 0 (control), 17, 20, 23, 27, and 30 kV cm ⁻¹ , 50 mL min ⁻¹ flow rate, 3 ms pulse duration, 500 pps repetition rate, and t _{1/4} 131 ms; E = 17 kV cm ⁻¹ , 3 ms pulse duration, 50 mL min ⁻¹ flow rate, t _{1/4} 0 ₁ control), 66, 105, 131, 157 and 210 ms E = 40 kV cm ⁻¹ ; t _{1/4} 240 ms	Inactivation of <i>L. monocytogenes</i> was significantly increased with increased electric field strength and treatment time (p 0.05) Achieving a synergic effect (treatment þ storage) of 3.5 decimal reductions of <i>L. monocytogenes</i>	Altuntas <i>et al.</i> (2010) Rivas, Sansano, Perez, Martinez, and Rodrigo (2016)
	Beverage	E = 40 kV cm ⁻¹ ; t _{1/4} 240 ms; and add stevia (2.5% (w/v))	Achieving a synergic effect (treatment þ storage) of 2.17 decimal reductions of <i>L. monocytogenes</i>	Rivas <i>et al.</i> (2016)
	Liquid whole egg	PEF (25 kV/cm; 75 kJ/kg) followed by heat (60 C/3.5 min) in the presence of 1% triethyl citrate	The populations of <i>L. monocytogenes</i> reduced by 4.6 ± 0.7 log ₁₀ .	Monfort <i>et al.</i> (2012)

Salmonella sp.	Liquid whole egg	E = 45 kV cm ⁻¹ ; t¼ 30 ms	The populations of S. Typhimurium reduced by 4 log ₁₀ .	Monfort <i>et al.</i> (2010)
	Liquid whole egg	PEF (25 kV/cm; 75 kJ/kg) followed by heat (60 C/3.5 min) in the presence of 1% triethyl citrate	The populations of S. Senftenberg 775 W reduced by 5.6 ± 0.1 log ₁₀ .	Monfort <i>et al.</i> (2012)
	Melon juice	E = 35 kV cm ⁻¹ ; t¼ 1440 ms; f ¼ 217 Hz; T 40 C	The populations of S. Enteritidis reduced by 3.7 ± 0.3 log ₁₀	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2007)
	Watermelon juice	E = 35 kV cm ⁻¹ ; t¼ 1727 ms; f ¼ 188 Hz; T 40 C	The populations of S. Enteritidis reduced by 3.56 ± 0.12 log ₁₀	Mosqueda-Melgar <i>et al.</i> (2007)

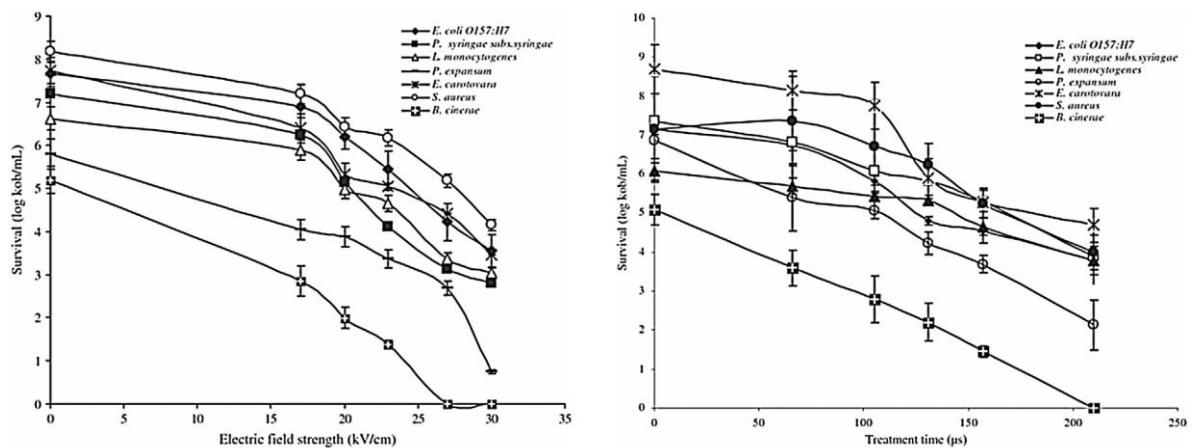


Figura 2.2 - Inattivazione di *E. coli O157: H7*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. syringae subs. syringae*, *E. carotovara*, *P. expansum* e *B. cinerea* inoculati in succo di amarena mediante PEF in funzione della forza del campo elettrico (n: 12) e del tempo di trattamento (n: 12) (Altuntas *et al.*, 2010).

Tuttavia, l'efficienza di inattivazione dei microrganismi, dipende da molti fattori. Kuldiloke ed Eshtiaghi (2008), hanno concordato sul fatto che la resistenza del campo elettrico e il tempo di trattamento hanno avuto un'influenza significativa sull'inattivazione microbica.

D'altra parte, fattori legati al mezzo di trattamento come conduttività elettrica, pH e forza ionica media e quelli relativi al microrganismo quali specie, lo stadio di crescita, la concentrazione, la dimensione e la forma, hanno avuto anche effetti significativi sull'efficienza di inattivazione, e quindi

dovrebbero essere considerati (Amiali & Ngadi, 2012; Stoica, Bahrim, & Carac, 2011). Tuttavia, tra i parametri microbici, il tipo di microrganismo, è un fattore critico che influenza l'efficienza di inattivazione del trattamento con la PEF (Li & Farid, 2016). L'adozione della PEF per la pastorizzazione commerciale non termica di succhi di frutta, è stata implementata per la prima volta da Genesis Juices, Oregon, USA (Clark, 2006).

Oltre al utilizzo da sola, la PEF è stata combinata con successo con altre tecnologie non termiche come l'irradiazione UV, microonde, impulsi di luce ad alta intensità (HILP) (Fig. 2.2) e alta pressione idrostatica (HHP) per ottenere l'inattivazione batterica (Caminiti *et al.*, 2011, Stoica *et al.*, 2013). Caminiti *et al.* (2011), hanno rilevato che quando il trattamento con la PEF sul succo di mela è stato seguito dall'HILP, l'inattivazione di *E. coli* è aumentata significativamente ($p < 0,001$), e la conta vitale era inferiore al livello di rilevazione ($< 1 \text{ log cfu / ml}$) (Figura 2.3) Al contrario, il numero di sopravvissuti era di $1.85 \text{ log cfu / ml}$ quando veniva applicata la sequenza inversa.

Ci sono anche rapporti in cui la PEF, combinata con il trattamento termico, può ottenere alte riduzioni di microrganismi (Bermúdez-Aguirre, Dunne e Barbosa-Canovas, 2012; Monfort, Sagarzazu, Condon, Raso e Alvarez, 2012).

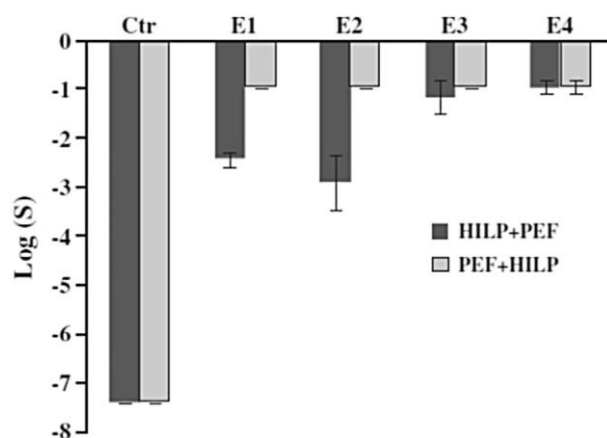


Figura 2.3 - Inattivazione di *E. coli* K12 in succo di mela trattato con i metodi sopra citati. (Caminiti *et al.*, 2011).

CAPITOLO 3

EFFETTI SUB LETALI DELLA PEF SULLE CELLULE MICROBICHE

3.1 Premessa

Le membrane delle cellule, sia di quelle vegetali che di quelle microbiche, nel momento in cui vengono esposte ad un trattamento con la PEF, sono più o meno colpite, a seconda dell'intensità del trattamento. Ad esempio, gli studi hanno dimostrato che i tessuti della pianta, vengono disgregati durante il trattamento con PEF a temperatura ambiente e intensità del campo elettrico moderato (MEF) di 0,5 e 5,0kV / cm per 104 a 102 s. C'è una rottura completa delle membrane microbiche con una forza di campo di 15kV / cm (Gonzalez e Barrett, 2010). Pertanto, la tecnologia PEF è utile per l'inattivazione di microrganismi nocivi per l'uomo, compresi quelli alimentari e microrganismi patogeni (Sharma *et al.*, 2014). Gli effetti letali della PEF sui microrganismi sono stati inizialmente proposti negli anni '60 (Hamilton e Sale, 1967).

Negli ultimi 50 anni, ci sono stati molti studi sull'elettroporazione di cellule animali e vegetali, nonché sull'inattivazione dei batteri esposti a PEF (Hülshager *et al.*, 1983; Pankiewicz *et al.*, 2017; Pillet *et al.*, 2016). Attualmente, si pensa che gli effetti letali sulle cellule sono strettamente correlate alla rottura della membrana cellulare, che è il risultato dell'esposizione ai campi elettrici ad alta intensità, mentre la temperatura di trattamento è mantenuta controllata a meno di 40°C (Andre *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011). Per l'inattivazione microbica, sono stati proposti due meccanismi, quali: rottura elettrica ed elettroporazione. (Ravishankar *et al.*, 2008). Gli studi della PEF si sono principalmente concentrati sulla valutazione del potenziale utilizzo della tecnologia come pastorizzazione, cioè un processo alternativo o complementare a quella termica tradizionale.

Sampedro *et al.* (2007), hanno studiato l'inattivazione del *Lactobacillus plantarum* sospeso in una base di latte e succo d'arancia, con l'applicazione di un'intensità del campo elettrico di 35kV / cm e tempo di trattamento di 100 ms. La popolazione dei microrganismi è diminuita rapidamente con un'inattivazione

di 1,5 log₁₀ cicli, dimostrando che l'inattivazione microbica potrebbe essere efficace con l'aiuto della tecnologia PEF sotto delle adeguate condizioni di lavoro.

Al fine di stimare il grado di inattivazione microbica e gli effetti letali del trattamento PEF, sono spesso applicati modelli matematici per valutare le condizioni di trattamento che potrebbero essere applicate per ottenere un determinato livello di carico microbico per il cibo o per i prodotti alimentari. Quindi, una serie di modelli cinetici, come quello di primo ordine di Hulsheger, distribuzione Weibull di Peleg e log-logistic, sono stati usati per descrivere l'inattivazione microbica della PEF in vari alimenti liquidi (Bigelow, 1921; Cole *et al.*, 1993; Hülshager e Niemann, 1980; Peleg, 1995; Weibull, 1951). Questi modelli cinetici di inattivazione microbica, indicano che l'inattivazione microbica finale da parte della PEF, di solito dipende da diversi fattori, che possono essere classificati così (Kang *et al.*, 2012; Wouters *et al.*, 2001):

- Parametri di processo, inclusa l'intensità del campo elettrico, ampiezza dell'impulso, forma d'onda, tempo di trattamento e temperatura;
- Parametri del prodotto, compresa la composizione, l'attività dell'acqua, pH, antimicrobici, composti ionici, conduttività e forza ionica;
- Caratteristiche microbiche, come: specie, dimensione, superficie cellulare, caratteristiche, carico microbico e fase di crescita.

Sempre più studi indicano che la maggior parte dei microrganismi ha un certo livello di resistenza al trattamento con PEF. Ad esempio, Somolinos *et al.* (2010), ha studiato la sopravvivenza di *E. coli* nel succo d'arancia a diversi valori di pH. Dopo il trattamento con PEF a 20kV / cm per 50 impulsi, il numero di cicli log₁₀ di celle inattivate, era statisticamente più alta a pH 7,0 rispetto a pH 4,0. A causa di tale resistenza al trattamento PEF, potrebbe essere inevitabile che ciò provochi un rischio per la salute e perdite di prodotti alimentari. Pertanto, è importante per la sicurezza alimentare indagare su quali siano gli effetti sub-letali sui microrganismi presenti in alimenti trattati con PE

3.2 Effetti sub-letali della PEF su diversi tipi di microorganismi

La tabella 3.1., fornisce un riepilogo dei risultati simili ottenuti da diversi ricercatori che hanno studiato gli effetti della PEF su diversi prodotti.

Tabella 3.1 - Effetti del trattamento PEF sui microorganismi in terreni selezionati (Man-Sheng Wang *et al.*, 2018)

Medium	Microorganisms	Treatment Conditions	Reduction of log ₁₀ Reference	Reference
1:5 v/v Maximum Recovery Diluents (MRD) solution	Campylobacter jejuni	NCTC Batch: 65 kV/cm, 5 ms, 500 Hz, <50 C	6.12	(Haughton <i>et al.</i> , 2012)
McIlvaine buffer, pH3.5	L. monocytogenes	STCC Continuous: 35kV/cm, 500ms, pulse width 3ms, <30 C	6.10	(Saldana <i>et al.</i> , 2010~)
Collagen gel biomatrices	S. cerevisiae	MUCL Continuous: 45 kV/cm, 100 pulses, <30 C	6.50	(Griffiths <i>et al.</i> , 2012)
0.024% NaCl solution	S. cerevisiae Maurivin™ R2	Continuous: 30kV/cm, 1000 Hz, pulse width 40ms, <30 C	2.31	(Wang <i>et al.</i> , 2016c)
1:20 v/v yeast extract medium diluted solution	E. coli (CGMCC 1.90); S. cerevisiae (CGMCC 2.604)	Continuous: 5 kV/cm, 25 ms, 48 C	5.30	(Tao <i>et al.</i> , 2015)
E. coli broth	E. coli phages M13mp18 phage	Continuous: 5 kV/cm, 25 ms, 48 C	5.03	(Tanino <i>et al.</i> , 2015)

0.05% mycological peptone	S. cerevisiae	Continuous: 67 kV/cm, 1 ms, 100 impulses, <27 C	3.00	(Qin <i>et al.</i> , 2015)
	MUCL 28749			
Carboxymethyl cellulose solution	Enterobacter aerogenes	Continuous: 50 kV/cm, 530 ns, 40 C	2.10	(Kajiwara <i>et al.</i> , 2015)
	ATCC 13048			
Skim milk	Bacillus cereus spores	Continuous: 40 kV/cm, 2.5 ms, 10 Hz, 276 pulses, 65 C	2.50	(Bermúdez- Aguirre <i>et al.</i> , 2009)
Liquid Whole Egg (LWE)	Salmonella Typhimurium	Continuous: 45 kV/cm, 30 ms, <35 C	4.0	(Monfort <i>et al.</i> , 2010)
Citrate- phosphate buffer (pH 4.0)	Enterobacter sakazakii STCC	Continuous: 37 kV/cm, 100 pulses, <35 C	3.40	(Arroyo <i>et al.</i> , 2010)
Red Wine	L. plantarum CECT 220	Continuous: 31 kV/cm, 1 Hz, <30 C	5.00	(Puertolas <i>et al.</i> , 2009)
Grape juice	Gluconobacter oxydans	Continuous: 27.5 kV/cm, 1 ms, 100 Hz < 35 C	1.90	(Marsellesfontanet <i>et al.</i> , 2009)
Melon juice	E. coli;	Continuous: 35 kV/cm, 400 pulses,	3.80 4.30 3.90	(Mosqueda- Melgar <i>et al.</i> , 2007)
	Salmonella Enteritidis;			
	L. monocytogenes			

In base al grado di danneggiamento delle membrane delle cellule esposte in un campo elettrico, i pori generati possono essere principalmente suddivisi in due tipi:

- pori irreversibili, implicano che la cellula sia morta o incapace di riparare il danno in modo che alla fine muoia
- pori reversibili, implicano che la cellula non sia morta e abbia il potenziale per recuperare (Pinaperez *et al.*, 2009; Tsong, 1991).

Pagan and Manas (2006), hanno affermato che il trattamento con PEF a varie intensità e tempi di durata (che vanno da microsecondi a millisecondi), può causare una permeabilizzazione temporanea o permanente delle membrane cellulari, e poiché alcune cellule mostrano una resistenza al trattamento con PEF, si prevede che una certa percentuale di SIC, riuscirà a sopravvivere. Inoltre, a seconda dell'intensità del campo elettrico usato per trattare le cellule, e del grado di danno cellulare risultante (Figura 3.1), le cellule possono essere suddivise in tre diversi tipi fisiologici (Jaeger *et al.*, 2009):

- 1) cellule morte che mostrano una perdita di integrità della membrana e dell'attività esterasica
- 2) cellule intatte che mantengono sia la membrana intatta sia l'attività metabolica
- 3) in mezzo, i SIC che mostrano una perdita dell'integrità della membrana ma continuano la loro attività metabolica.

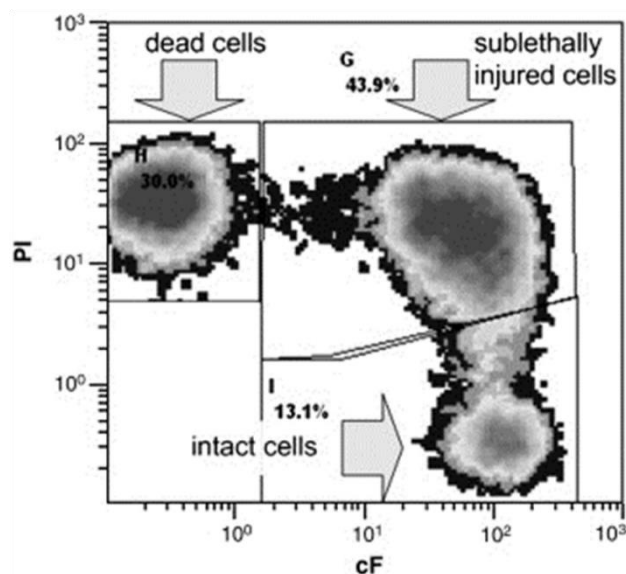


Figura 3.1 - Analisi dell'influenza del trattamento con PEF sul *Lactobacillus rhamnosus*. (Jaeger *et al.*, 2009)

3.3 Fattori che influenzano la resistenza delle cellule microbiche

Diverse cellule, sia con che senza pareti, hanno tolleranze diverse per i campi elettrici. Pertanto si possono prevedere effetti diversi, in base al tipo di cellula che viene esposta al trattamento con PEF a parità di intensità. Diversi

studi, hanno osservato la resistenza al trattamento della PEF esibita da diversi microrganismi, e hanno riportato l'influenza dei parametri di processo e dei fattori ambientali su tali risposte (García *et al.*, 2003). Ad esempio, Somolinos *et al.* (2008a), ha studiato la resistenza di *E. coli* al trattamento con PEF, e ha scoperto che oltre il 99% del ceppo sensibile, BJ4L1, è sopravvissuto dopo il trattamento con PEF (50 impulsi, forma d'onda esponenziale e una frequenza di ripetizione dell'impulso di 1 Hz a 25kV / centimetro).

Cebrian *et al.* (2007), hanno anche esaminato la sopravvivenza di quattro ceppi enterotossigeni di *Staphylococcus aureus*, esposti a un trattamento PEF di 100 impulsi a 26kV / cm, e hanno osservato un aumento della loro resistenza a PEF quando i batteri erano nella loro fase stazionaria di crescita cellulare. Inoltre, Sagarzazu *et al.* (2010), hanno studiato la resistenza di *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 a PEF sotto i 15 e 35kV / cm, mentre i batteri sono stati sospesi in mezzi di recupero a diversi valori di pH.

Altro aspetto importante è il fatto che l'acidificazione del mezzo (variabile da pH 7,0 a 4,5) ha provocato una maggiore resistenza delle cellule alla PEF.

Anche Saldana *et al.* (2009) e Jaeger *et al.* (2009), hanno dimostrato che le condizioni di processo esterne, come l'intensità del campo elettrico e il pH del mezzo di trattamento, hanno svolto un ruolo importante nel tasso di cellule morte o SIC. Questi studi dimostrano l'importanza di comprendere il recupero e la crescita dei SIC dopo il trattamento della PEF. Ad esempio, i risultati sopra citati indicano che il trattamento con PEF di alimenti a basso pH, può essere di particolare preoccupazione, data la potenziale sopravvivenza delle cellule a pH basso. Quindi gli effetti letali e sub-letali del trattamento con PEF sulle cellule, dipenderanno in gran parte dai parametri di processo, dalle variabili chimico fisiche del prodotto e dalle caratteristiche delle cellule stesse (García *et al.*, 2005, 2007). Ad esempio, Mosqueda-Melgar *et al.* (2007), hanno studiato l'influenza dei trattamenti PEF (resistenza massima del campo elettrico 35kV / cm, durata dell'impulso 4ms, tempo di trattamento fino a 2000ms e

frequenza degli impulsi compresa tra 100 e 250 Hz) su *Salmonella Enteritidis* inocolata nel succo di melone (pH $5,82 \pm 0,04$).

Una riduzione microbica significativamente più alta, è stata ottenuta quando il succo è stato trattato con impulsi da 2000ms invece di impulsi da 1250ms. Oltre alle condizioni di trattamento, anche le caratteristiche del liquido che viene trattato (ad esempio pH come già detto) hanno un impatto significativo sugli effetti sub-letali delle cellule. Ad esempio, Somolinos *et al.* (2010), hanno studiato la resistenza di *E. coli* a PEF usando un mezzo di trattamento a basso pH. I risultati hanno mostrato che gli effetti protettivi sulle cellule di *E. coli*, erano principalmente dovuti alla presenza di acidi organici a pH 4,0 e gli effetti protettivi dell'acido citrico dipendevano dalla sua concentrazione; in particolare, la lesione sub-letale non era rilevabile a pH 5,0 e 7,0 e raggiungeva il 95% a pH 4,0.

In generale, i costituenti alimentari esercitano effetti protettivi sui microrganismi esposti a PEF. Ad esempio, Jaeger *et al.* (2009), hanno confrontato l'effetto protettivo dei costituenti del latte, durante l'inattivazione della PEF del *Lactobacillus rhamnosus*. I parametri di trattamento della PEF che si sono dimostrati efficaci in un sistema sintetico, dovrebbero essere validati in sistemi alimentari reali, al fine di assicurare che il livello previsto di riduzione microbica sia raggiunto. In un altro caso, Cebrian *et al.* (2007), hanno esaminato la sopravvivenza di quattro ceppi enterotossigeni di *S. aureus*, trattati a una intensità di campo elettrico di 26kV / cm e 100 impulsi. I risultati hanno mostrato che la capacità dei SIC di sopravvivere al trattamento con PEF, era strettamente correlata alla fase di crescita dei ceppi, una proprietà che è stata spiegata più chiaramente dalle differenze nello sviluppo della pigmentazione dei carotenoidi. Anche le caratteristiche delle cellule, inclusi: specie microbica, la concentrazione, le dimensioni e lo stadio di crescita, giocano un ruolo significativo nella resistenza alla PEF.

Generalmente, i batteri Gram-negativi sono spesso meno resistenti alla PEF rispetto ai batteri Gram-positivi. Inoltre, rispetto ai batteri, i lieviti sono più sensibili ai campi elettrici, perché le cellule del lievito hanno una dimensione relativamente maggiore, e quindi sono più suscettibili ai danni

dell'elettroporazione da parte di ambienti esterni. Un'altra osservazione fu quella di scoprire che rispetto alle cellule vegetative, le spore batteriche (eccetto le spore in germinazione) e le ascospore delle muffe, mostrano un tasso di mortalità più basso e lasciano più SIC dopo essere stati sottoposti a trattamento con PEF (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009).

3.4 Meccanismi di protezione e cambiamenti metabolici nei SIC

Sebbene gli studi citati sopra mostrino chiaramente la resistenza delle cellule esposte ai trattamenti con PEF, la base biologica per questa risposta non è stata ancora ben compresa. Quindi, i meccanismi di protezione o di riparazione, e i cambiamenti metabolici per i SIC indotti dal trattamento con PEF, recentemente sono stati studiati con maggiore attenzione. Ad esempio, García *et al.* (2006), hanno riportato i requisiti biosintetici per la riparazione dei danni sub-letali alla membrana nelle cellule di *E. coli* dopo l'esposizione a PEF.

I risultati hanno mostrato che la sopravvivenza delle cellule dopo l'esposizione alla PEF, dipendeva dalla riparazione della membrana citoplasmatica, che era l'obiettivo direttamente coinvolto nell'inattivazione da PEF.

Altri studi hanno suggerito che le cellule trattate con PEF, inducano una risposta allo stress ossidativo nelle cellule, che potrebbe aumentare la loro resistenza alla PEF (Pakhomova *et al.*, 2012). Ad esempio, Tanino *et al.* (2012), hanno riportato che l'esposizione del lievito di *S. cerevisiae* alla PEF di 2 e 4kV / cm, ha indotto l'espressione dei geni legati alla risposta allo stress ossidativo, in particolare quelli che codificano gli enzimi di sintesi del glutatione.

Tuttavia, le stesse condizioni non hanno indotto la risposta allo stress da calore. Le loro scoperte sono riassunte nel diagramma schematico in Figura 3.2, il quale mostra che i geni che codificano gli enzimi di sintesi del glutatione e i geni che codificano la superossido dismutasi che sono coinvolti nello scavenging dei radicali, sono stati tutti influenzati dal trattamento con PEF.

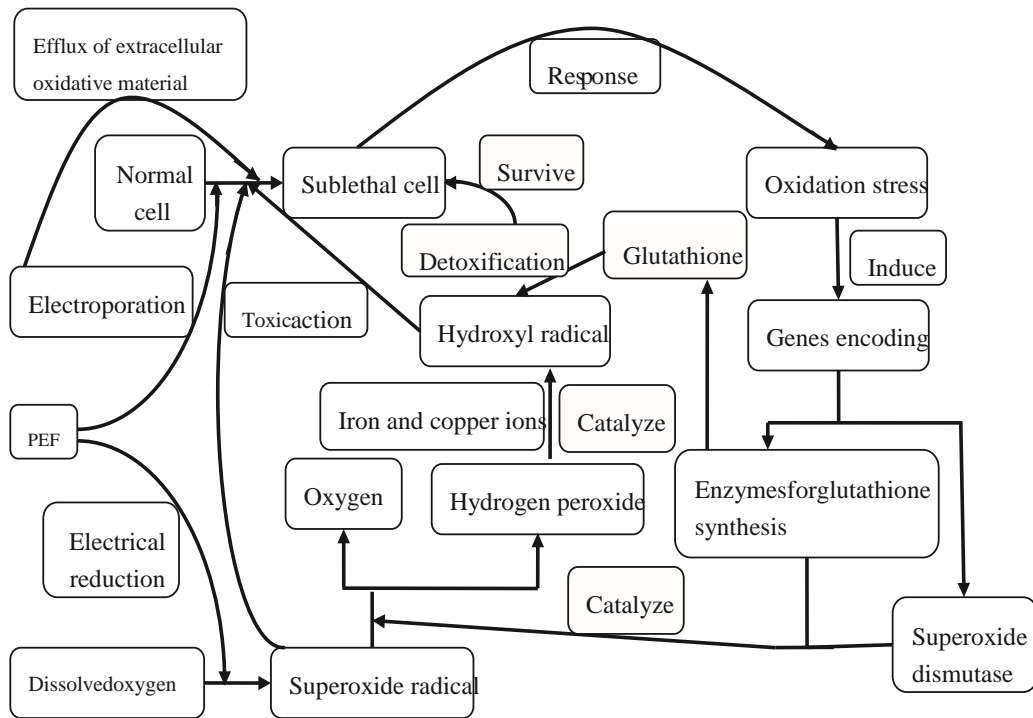


Figura 3.2 - Diagramma schematico del potenziale progresso di induzione delle cellule di *S. cerevisiae* esposte a PEF. Source (Tanino *et al.*, 2012).

Tra i geni che rispondono allo stress ossidativo, i geni che codificano gli enzimi per la sintesi del glutathione, sono stati indotti più facilmente di quelli che codificano la superossido dismutasi (Tanino *et al.*, 2012).

Per spiegare, la PEF crea uno stress ossidativo, che può uccidere i microrganismi, e questo stress ossidativo si traduce in un feedback che aumenta la produzione di glutathione e superossido dismutasi al fine di ridurre lo stress ossidativo. Questa risposta si traduce in protezione contro il danno sub-letale indotto in questo caso dalla PEF determinando il recupero delle cellule. Esistono diversi metodi per studiare gli effetti sub-letali della PEF sulle cellule, comprese tecniche di rilevamento impedimetrico, metodi di colorazione cellulare rapida, tecniche dielettriche, microscopia elettronica, FCM e tecniche di marcatura del mezzo, sia selettiva che non selettiva (Li *et al.*, 2010; Patel e Markx, 2008; Perni *et al.*, 2007; Somolinos *et al.*, 2008b; Yaqub *et al.*, 2004). Inoltre Wu (2008), ha anche evidenziato l'importanza di sviluppare nuovi metodi per rilevare microrganismi patogeni di origine alimentare. Sonde fluorescenti che si legano ai composti intracellulari, sono state usate frequentemente per studiare la

formazione temporanea dei pori nelle membrane cellulari a diverse frequenze di MEF e fasi di crescita cellulare.

Loghavi e Laleh (2008), hanno mostrato che i pori delle cellule sotto l'influenza di 45 e 60 Hz MEF, erano temporanei e che le cellule nella fase di latenza erano più sensibili alla permeabilizzazione, seguite da quelle nella fase di crescita esponenziale; al contrario, nessun elettroporazione è stata osservata durante la fase stazionaria. Pertanto, al fine di studiare e identificare i SIC in modo conveniente ed efficace, i metodi adeguati dovrebbero essere sviluppati e applicati con precisione.

3.5 Miglioramento dell'efficacia della PEF

Per ottenere prodotti sicuri con una lunga durata, è importante esplorare le tecnologie dei processi combinati che accoppiano i vantaggi della tecnologia PEF con altre tecniche che forniranno ulteriore garanzia di un'adeguata pastorizzazione. Queste tecniche aggiuntive, comprendono la regolazione della temperatura, la regolazione del pH, l'aggiunta di antimicrobici e altri metodi fisici. Con l'aiuto di questi metodi, le cellule sarebbero probabilmente più sensibili agli effetti letali del trattamento con PEF.

3.5.1 Regolazione della temperatura

La regolazione della temperatura, in questo contesto, significa riscaldare o raffreddare un campione dopo il trattamento con PEF al fine di migliorare gli effetti letali sui microrganismi nei prodotti alimentari. Monfort *et al.* (2012), hanno valutato gli effetti qualitativi della pastorizzazione, quando l'uovo intero liquido (LWE) è stato trattato con PEF (25kV / cm, 75kJ / kg) e poi trattato con calore (52°C per 3,5min, 55°C per 2min o 60°C per 1 minuto).

I risultati hanno dimostrato che i processi combinati, avevano letalità equivalente al trattamento di pastorizzazione termica da soli (ad esempio, 60°C per 30 minuti), ma si è ottenuto una migliore qualità di LWE. Nello specifico l'LWE trattato con PEF, ha mantenuto un colore più simile a quello dell'LWE grezzo, con una capacità schiumogena del 48% superiore, e una capacità emulsionante del 26% superiore rispetto all'LWE trattato solo termicamente.

Walkling-Ribeiro *et al.* (2008), hanno studiato il trattamento con PEF di *E. coli* K12, inoculato in un frullato di frutta tropicale, in combinazione con calore moderato. Hanno scoperto che il trattamento combinato ha provocato l'inattivazione di un maggior numero di cellule di *E. coli* rispetto alle cellule esposte al trattamento con PEF o un trattamento termico moderato da solo.

Zhao *et al.* (2009), hanno studiato la relazione tra la temperatura di conservazione (4°C, 25°C e 37°C) e la durata di conservazione microbiologica delle infusioni di tè verde trattate con PEF. I risultati hanno dimostrato che la popolazione microbica rimaneva sotto 1 log₁₀ CFU / mL, se conservata a 4°C per un massimo di 180 giorni, rispetto a soli 14 e 7 giorni per i campioni trattati conservati a 25°C e 37°C, rispettivamente.

3.5.2 Aggiunta di costituenti antimicrobici

Al fine di mantenere i prodotti alimentari più sicuri e più salutari, i costituenti antimicrobici, come nisina, lisozima, acido sorbico, citrico, enterocina, carvacrolo, timolo e cannella, possono essere aggiunti direttamente ai prodotti alimentari (Calderon-Miranda *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2013; Medeiros *et al.*, 2014; P *et al.*, 2008; Stratford *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016a). A volte, nonostante l'aggiunta di additivi antimicrobici, non sono stati osservati effetti significativi (Arroyo *et al.*, 2010). Tuttavia, altri studi hanno trovato significativi alcuni effetti di inattivazione dei costituenti antimicrobici in combinazione con il trattamento con PEF (Dutreux *et al.*, 2000; Sobrino-Lopez *et al.*, 2009).

3.5.3 Regolazione del pH

I microrganismi, di solito, presentano sensibilità diverse in risposta al trattamento con PEF, quando sono sospesi su terreni di diverso pH (Sagarzazu *et al.*, 2010). Ad esempio, Saldana *et al.* (2012), ha valutato l'influenza sinergica del pH (3.5 e 7.0) sull'inattivazione di due batteri Gram-negativi resistenti alla PEF. Inoltre, alcuni studi indicano che gli effetti sub-letali della PEF sulle cellule e la loro resistenza al trattamento con PEF, sono significativamente maggiori quando sono presenti sostanze antimicrobiche.

3.5.4 Combinazione con i metodi fisici

Oltre ai metodi sopra menzionati, volti a rafforzare gli effetti dell'inattivazione, sono stati applicati anche alcuni metodi fisici, come la luce ultravioletta, impulsi di luce ad alta intensità, ultrasuoni, anidride carbonica e alta pressione, per migliorare gli effetti letali del trattamento con PEF da solo (Gachovska *et al.*, 2008; Munoz *et al.*, 2012; Palgan *et al.*, 2012; ~ Pataro *et al.*, 2010).

CAPITOLO 4

ANALISI COMPARATIVA DEGLI EFFETTI DELLA PEF IN CONFRONTO AD ALTRE TECNOLOGIE NON TERMICHE

4.1 Premessa

Un certo numero di metodi diversi, tra cui campi elettrici pulsati (PEF), alta pressione idrostatica (HHP), ultrasuoni (US) e luce UV (UV), sono stati proposti come possibili alternative alle tecnologie tradizionali. Se vogliamo trovare un'applicazione per una nuova tecnologia di conservazione degli alimenti, inizialmente abbiamo bisogno di tali confronti per aiutarci a identificare quale sia la tecnologia più adatta per un prodotto specifico. In questo capitolo viene brevemente messa a confronto la resistenza dei vari patogeni di origine alimentare, a quattro tecnologie non termiche per la conservazione degli alimenti: US, PEF, HHP e UV. Di particolare interesse è l'influenza dei diversi fattori sulla resistenza degli agenti patogeni di origine batterica a queste tecnologie. La comparazione include anche dati relativi alla resistenza termica dei batteri.

I prerequisiti fondamentali per stabilire confronti significativi e trarre conclusioni robuste, è l'armonizzazione delle condizioni sperimentali. A questo proposito, grande vantaggio e interesse possono essere trovati confrontando i risultati ottenuti in sperimentazioni basate sugli stessi ceppi e gli stessi protocolli, per ottenere sospensioni, per recuperare cellule trattate, oltre che con l'utilizzo delle stesse matrici e identiche attrezzature. È stata presa quindi come fonte di dati l'Università di Saragozza, poichè negli ultimi 25 anni, l'ottenimento di tutti i suoi risultati è avvenuto seguendo protocolli standardizzati e quindi direttamente confrontabili tra loro. Analogamente agli ultrasuoni, gli obiettivi principali della PEF, sono gli involucri cellulari (Mañas e Pagán, 2005), poichè con questa tecnologia, si riesce a penetrare le membrane cellulari temporaneamente o permanentemente; un fenomeno noto come "elettropermeabilizzazione" o "elettroporazione". I microrganismi variano ampiamente nella loro resistenza alle quattro tecnologie non-termiche per la conservazione degli alimenti qui rivedute.

I lieviti e le muffe, sono molto più sensibili a MS, PEF e HHP rispetto alle cellule procariote (Raso *et al.*, 1994, Raso *et al.*, 1998b; Somolinos *et al.*, 2008b; Puértolas *et al.*, 2009), allo stesso tempo, però, sono più resistenti dei batteri ai raggi UV (Gayán, 2014; Gayán *et al.*, 2014a). D'altra parte, le spore batteriche, sono generalmente i microrganismi più resistenti agli stress fisici (Mañas e Pagán, 2005). Ciò vale per le quattro tecnologie qui considerate, oltre che per il calore.

I dati pubblicati, dimostrano che la PEF non influisce sulla vitalità delle spore (Pagán *et al.*, 1998, Raso *et al.*, 1998a, b. Mañas e Pagán, 2005; Álvarez *et al.*, 2006a), le quali sono anche estremamente resistenti a HHP; questo perché possiedono la capacità di resistere fino a 1000MPa, per intervalli di trattamento prolungati, a meno che non siano in uno stato di germinazione (Cheftel, 1995; Raso *et al.*, 1998c; Ramos, 2016).

Al contrario, i trattamenti MS e UV potrebbero essere utilizzati entrambi come metodi di sterilizzazione degli alimenti, poiché sono in grado di inattivare le spore. Sebbene le spore siano più resistenti alla MS e ai raggi UV rispetto alle cellule vegetative, va notato che la differenza di resistenza tra spore e cellule vegetative rispetto a MS (10 volte) e UV (da 3 a 50 volte) è trascurabile, se confrontata con 107 volte la differenza di resistenza al calore (Setlow, 2001; Condón *et al.*, 2011; Gayán *et al.*, 2013a).

Infine, i dati nella bibliografia indicano che i virus sarebbero ancora più resistenti delle spore agli UV (Gayán *et al.*, 2014a), e che la loro resistenza all'HHP sarebbe piuttosto eterogenea; ma per alcuni di essi (come il virus umano del rotavirus e dell'epatite A) sarebbe paragonabile a quello delle forme vegetative dei batteri (Smelt, 1998; Khadre and Yousef, 2002; Kingsley *et al.*, 2002).

D'altra parte, i virus mostrerebbero un'alta resistenza alla PEF (Khadre and Yousef, 2002). Inoltre, non sono disponibili dati sulla resistenza dei virus agli ultrasuoni. Poiché, come sottolineato sopra, non tutte le tecnologie qui recensite sono utili ai fini della sterilizzazione, le prossime considerazioni riguarderanno solo quelle specie che sono rilevanti nei processi di pastorizzazione degli alimenti. Secondo i dati dell'EFSA (EFSA, 2014), i batteri

più frequentemente responsabili di casi di malattie umane e / o focolai di origine alimentare sono *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.* D'altra parte, lo *Staphylococcus aureus* è la causa principale di intossicazioni alimentari. Molte altre specie sono in grado di causare malattie di origine alimentare nell'uomo, ma la *Listeria monocytogenes*, e alcuni ceppi di *Escherichia coli*, si distinguono tra gli altri a causa dell'alto tasso di mortalità.

Ad oggi, c'è un nuovo patogeno, il *Cronobacter sakazakii*, il quale è un patogeno emergente che ha recentemente suscitato un grande interesse, dopo aver causato diversi focolai e casi di infezione neonatale (Arroyo *et al.*, 2009). Per quanto riguarda la cinetica dell'inattivazione microbica da parte di queste tecnologie, si può concludere che le curve di sopravvivenza MS tendono a mostrare un profilo lineare (Condón *et al.*, 2011).

Le curve di sopravvivenza della PEF, di solito presentano code (Álvarez *et al.*, 2000, 2002, 2003a, c, d, e; Raso *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2005; Cebrián *et al.*, 2007, 2009; Arroyo *et al.*, 2010a, Sagarzazu *et al.*, 2010b; Saldaña *et al.*, 2010a, b, c), mentre l'insorgenza di spalle nelle curve di sopravvivenza della PEF è molto più insolita; le spalle sono state trovate solo nelle curve di sopravvivenza della PEF delle cellule di *C. sakazakii*, trattate in mezzi con aw ridotta (Arroyo *et al.*, 2010a). Le curve che invece presentano quasi sempre spalle, sono quelle dell'UV (Gayán *et al.*, 2011, 2012a, b, c, 2014b, 2015; Arroyo *et al.*, 2012b).

Per quanto riguarda il profilo delle curve di sopravvivenza alle HHP, esso varia ampiamente a seconda del ceppo, del trattamento e delle condizioni medie; può essere lineare, concavo, convesso o addirittura sigmoideo (Mañas e Pagán, 2005; Somolinos *et al.*, 2008b; Cebrián *et al.*, 2009, 2010a; Arroyo *et al.*, 2011a; Ramos, 2016). Le deviazioni dalla linearità nelle curve di sopravvivenza hanno implicazioni pratiche molto rilevanti, e spesso sono necessari nuovi modelli matematici per descrivere la cinetica osservata.

In effetti, molti modelli ed equazioni sono stati sviluppati e applicati. D'altra parte, questa ampia varietà di modelli, rende molto difficile stabilire confronti significativi.

Per affrontare questo ostacolo, useremo il tempo o la dose necessaria per inattivare 4 cicli di log (valore 4D), come parametro per confrontare la resistenza degli agenti patogeni di origine alimentare batterica alle diverse tecnologie qui recensite.

4.2 Resistenza comparativa dei patogeni alimentari a MS, PEF, HHP E UV

La resistenza relativa dei batteri patogeni trasmessi dagli alimenti al calore (A), a MS (B), PEF (C, D), HHP (E) e UV (F) quando trattati in tampone McIlvaine di pH 7.0 (ad eccezione della figura D, dove i dati provengono da cellule pre-trattate a pH 4.0), è illustrata nella Figura 4.1.

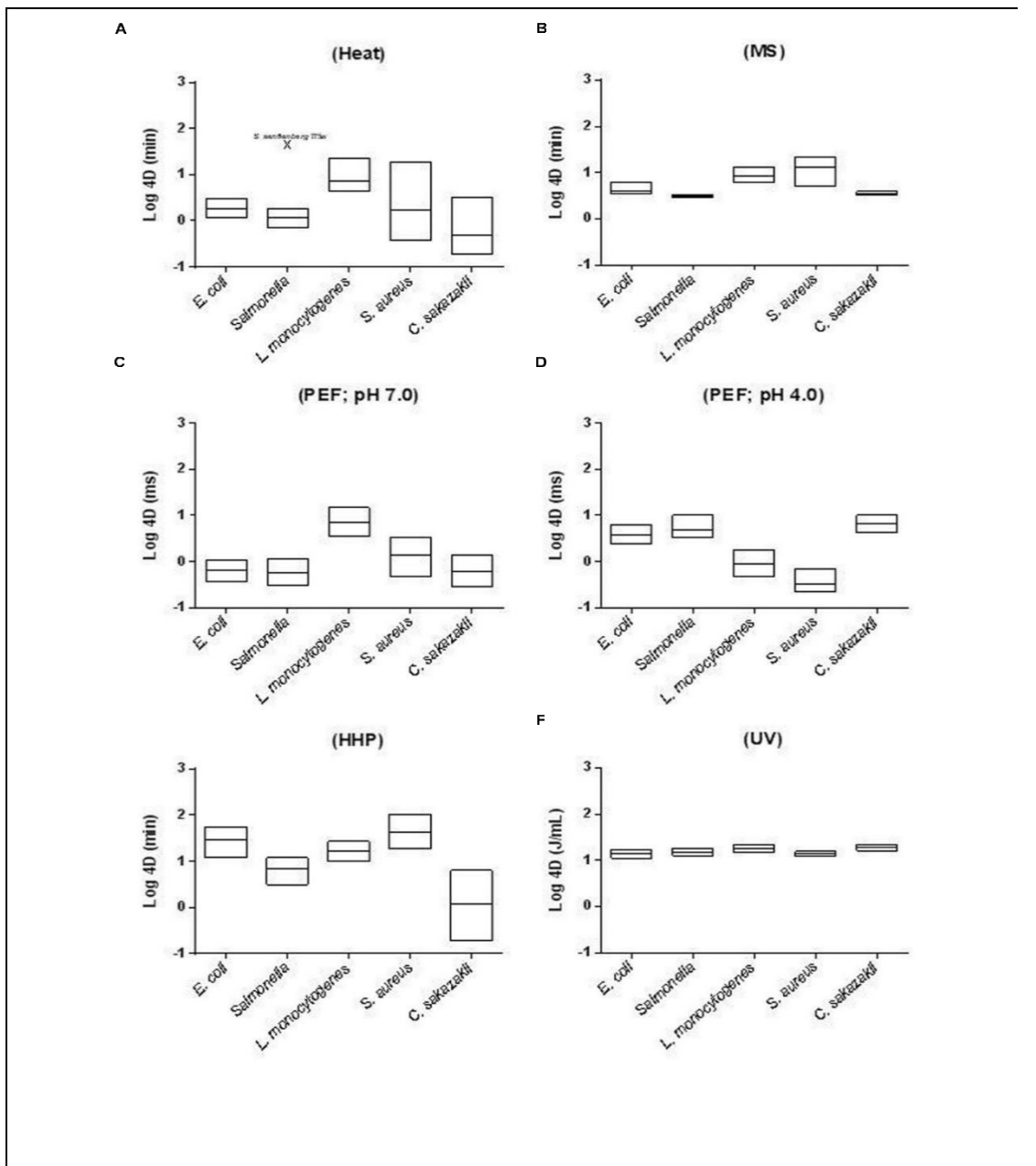


Figura 4.1 - Differenze inter e intraspecifiche nella resistenza di diversi agenti patogeni di origine alimentare ai diversi trattamenti. (Cebrian et al., 2016).

Il dato sulla resistenza ai trattamenti termici, è anche incluso per scopi comparativi (A). Nella figura, le barre indicano i valori 4D per il ceppo più resistente (massimo) e meno resistente (minimo), di ciascuna specie. Pertanto, la lunghezza della barra, riflette le differenze intraspecifiche nella resistenza. La linea all'interno della barra corrisponde al valore medio 4D per ciascuna specie. Come si può osservare, lo *S. aureus* è il patogeno più resistente alla MS e *Salmonella enterica* e *C. sakazakii*, sono i più sensibili (Pagán et al., 1999a, c. Mañas et al., 2000a; Álvarez et al., 2003b, 2006b; Rodríguez-Calleja et al., 2006; Arroyo et al., 2010b).

Le differenze inter- e intra-specifiche nella resistenza alla MS erano molto piccole. Pertanto, i valori di resistenza 4D a MS inter-specifici variavano di 3,5 volte, e quelli intraspecifici a 4,5 volte (Figura 4.1B). Le differenze inter-specifiche nella resistenza, erano inferiori anche per i trattamenti UV (meno di 1,5 volte). In questo caso, *L. monocytogenes* appariva come la specie più resistente e *S. enterica* come la più sensibile. Anche le differenze intraspecifiche nella resistenza agli UV erano molto basse, specialmente se confrontate con la resistenza intraspecifica ad altre tecnologie; tuttavia, tali differenze sono di entità simile o persino maggiore delle differenze inter-specifiche nella resistenza agli UV (Gayán et al., 2011, 2012a, b, c, 2014b, 2015; Arroyo et al., 2012b). Ancora una volta, *S. aureus* appare come il microrganismo più resistente alla tecnologia, mentre *Salmonella* e *C. sakazakii* come i meno resistenti.

Va sottolineato che alcuni ceppi di *E. coli* sono molto resistenti all'HHP (Somolinos et al., 2008b; Cebrián et al., 2009, 2010a; Sagarzazu et al., 2010a; Arroyo et al., 2011a; Espina et al., 2013; Ramos, 2016). Sebbene non sia incluso nella figura 4.1, il *Campylobacter* è il microrganismo meno resistente all'HHP tra quelli studiati (Sagarzazu et al., 2010a). Va osservato che, al contrario di MS e UV, la resistenza dei patogeni trasmessi dagli alimenti all'HHP varia ampiamente. Pertanto, sia le differenze inter-specifiche che quelle intra-specifiche nella resistenza all'HHP (valori 4D) sono

maggiori di 30 volte come riportato in Figura 4.1. E. Per quanto riguarda la PEF, va notato che alcune condizioni di trattamento modificano solo la

	Heat	MS	PEF	HHP	UV
pH 7.0	<i>S. senftenberg 775 W</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes*</i>
$a_w > 0.99$					
pH 4.0	<i>S. senftenberg 775 W</i>	<i>S. aureus**</i>	<i>Gram-negatives***</i>	<i>S. aureus****</i>	<i>L. monocytogenes*</i>
$a_w > 0.99$				<i>E. coli</i>	
pH 7.0	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes*</i>
$a_w = 0.96$					

resistenza batterica (vedi pH del mezzo di trattamento). Per questo motivo, la Figura 4.1. include i valori 4D PEF sia a pH 7.0 (4.1. C) sia a pH 4.0. (4.1. D).

La specie più resistente alla PEF a pH 7,0 sarebbe la *L. monocytogenes*. Viceversa, *E. coli*, *C. sakazakii* e *Salmonella* sarebbero i più resistenti a pH 4,0 (Tabella 4.1.).

Tabella 4.1 -Agenti patogeni resistenti al calore, MS, PEF, HHP e UV, se trattati con un diverso pH e diversa a_w . (Cebrian et al. 2016).

Tuttavia, va notato che, dai dati di Saldaña *et al.* (2010a, b), si può dedurre che la resistenza PEF di alcuni ceppi di *L. monocytogenes* sarebbe paragonabile a quella dei Gram-negativi.

Per quanto riguarda *Campylobacter*, i dati ottenuti da Sagarzazu *et al.* (2010b), dimostrano che mentre il *Campylobacter jejuni* è il meno resistente a HHP e al calore, la sua resistenza al PEF sarebbe paragonabile a quella degli altri tre Gram-negativi considerati.

Sebbene siano presenti in letteratura alcune eccezioni, Rodríguez-Calleja *et al.* (2006) hanno dimostrato che anche le differenze intraspecifiche nella resistenza alla PEF sono molto basse. Al contrario, le differenze inter-specifiche sono molto più ampie (García *et al.*, 2005a, b, 2007; Cebrián *et al.*, 2007; Arroyo *et al.*, 2010a; Somolinos *et al.*, 2010b).

Pertanto, dalla figura si può concludere che la resistenza ai patogeni può variare fino a 12 volte a pH 7,0 e oltre 18 volte a 4,0. In ogni caso, le differenze

inter- e intra-specifiche nella resistenza al calore, superano quelle evidenziate in altre tecnologie, (Figura 4.1. A). Le grandi differenze intraspecifiche nella resistenza al calore sono particolarmente evidenti per *S. aureus*, *C. sakazakii* e *Salmonella* (Mañas *et al.*, 2001b, 2003; Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2007; Arroyo *et al.*, 2009). Tuttavia, va notato che per la *Salmonella* queste differenze sono più piccole, se escludiamo *S. senftenberg 775 W*. Questo particolare ceppo, mostra una resistenza al calore 10-100 volte maggiore di qualsiasi altra specie dello stesso genere.

Per quanto riguarda i microorganismi patogeni più resistenti al calore, *S. senftenberg 775 W*, *L. monocytogenes* e alcuni ceppi di *S. aureus* sarebbero i più resistenti al calore, mentre *Campylobacter* sarebbe il meno resistente al calore (Sagarzazu *et al.*, 2010b).

Dai dati qui presentati, si può concludere che il microorganismo più resistente alla MS e all'HHP in termini di resistenza media delle specie, sarebbe lo *S. aureus*. La *L. monocytogenes* sarebbe la più resistente ai raggi UV, alla PEF a pH 7,0 e al calore.

Infine, *Salmonella*, *E. coli* e *C. sakazakii*, sarebbero i microorganismi più resistenti alla PEF quando il pH del trattamento scenderà a 4,0 (Tabella 4.1.). I fattori che influenzano la resistenza microbica, come già detto, sono numerosissimi; quindi, queste conclusioni vanno viste con attenzione. Esse infatti si basano sul confronto della resistenza di cellule in fase di crescita stazionaria coltivate in Tryptic Soy Broth (TSB) a 37°C, trattate con tampone McIlvaine a pH 7,0 e recuperate in Tryptic Soy Agar (TSA), anch'esse a 37°C. Tuttavia, se le condizioni di crescita, trattamento o recupero vengono modificate, le specie / ceppi più resistenti a una particolare tecnologia possono cambiare.

Quindi, poiché esistono fattori che influenzano la resistenza microbica a MS, PEF, HHP e UV, sono riportati alcuni dati per evidenziare se la modifica di qualsiasi condizione sperimentale, porterebbe a cambiamenti nella classificazione che abbiamo presentato (Tabella 4.1.).

Da questi dati si possono anche dedurre che i patogeni Gram-positivi (*S. aureus* e *L. monocytogenes*), sono quelli che mostrano la massima resistenza a

MS, PEF, HHP e UV nella maggior parte degli scenari. La maggiore rigidità degli involucri Gram-positivi, è considerata la ragione principale della loro forte resistenza agli ultrasuoni e all'HHP (Mañas e Pagán, 2005), poiché la modalità di azione di entrambe le tecnologie, comporta danni fisici all'involucro. Inoltre, le dimensioni e la forma di *S. aureus*, potrebbero spiegare la sua maggiore resistenza alla MS e HHP, rispetto alla *L. monocytogenes* (Mañas e Pagán, 2005; Condón *et al.*, 2011).

Tuttavia, l'alta resistenza di alcuni ceppi di *E. coli* (più alta di quella delle cellule di *L. monocytogenes*), indica che probabilmente fattori diversi dalla struttura dell'involucro, giocano anche un ruolo molto rilevante nella resistenza HHP (Somolinos *et al.*, 2008b; Espina *et al.*, 2013; Ramos, 2016). Allo stesso modo, anche se è stato spesso riportato che i batteri Gram-positivi generalmente mostrano una maggiore resistenza ai raggi UV e alla PEF, rispetto ai Gram-negativi (l'elevata resistenza della *L. monocytogenes* a queste tecnologie sembra supportare questa ipotesi), ci sono molte eccezioni a questa regola. Infatti, come già detto, la resistenza microbica alla PEF, sarebbe determinata da molti fattori, tra cui dimensione e forma, struttura degli involucri e alcuni altri, non ancora chiariti (Qin *et al.*, 1991, 1998; Kehez *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2006a; Somolinos *et al.*, 2010b). L'aumento della resistenza batterica ai raggi ultravioletti, sarebbe probabilmente dovuto ad una serie di fattori che, a partire dallo spessore della parete cellulare, potrebbero includere anche la dimensione delle cellule, la pigmentazione, la composizione, le dimensioni, la conformazione del materiale genetico e l'efficienza della riparazione del DNA (Gayán *et al.*, 2014a).

Inoltre, come discusso sopra, la variabilità della resistenza UV tra specie e ceppi, è maggiore delle differenze tra i generi, il che rende impossibile trarre conclusioni generali (Gayán *et al.*, 2014a). Si può concludere che, da un lato, come sottolineato in precedenza da Rodríguez-Calleja *et al.* (2006) e Cebrián *et al.* (2007), questi risultati mostrano che i microrganismi più resistenti a un dato stress, non sono necessariamente più resistenti ad altri tipi di stress.

Così, ad esempio, mentre lo *S. aureus* era il microrganismo più resistente all'HHP e alla MS, era tra i meno resistenti agli UV e alla PEF.

Allo stesso modo, vale la pena ricordare che, mentre la resistenza al calore di *S. senftenberg* 775 W è 10-100 volte maggiore di quella di tutte le altre specie, la sua resistenza a MS, PEF o UV e persino HHP, si trova approssimativamente nella media (Mañas *et al.*, 2000b, 2001b, Álvarez *et al.*, 2003a, 2006b; Gayán, 2014; Ramos, 2016). Questo risultato può essere facilmente spiegato dalle varie modalità di azione delle quattro diverse tecnologie in esame.

D'altra parte, riassumendo, i dati riportati indicano che le differenze intra e inter-specifiche della resistenza, sono molto basse per la MS e soprattutto per i raggi UV. Invece tali differenze sono medio-grandi per HHP e PEF e molto grandi per il calore (Tabella 4.2.).

Tabella 4.2 -Fattori che influenzano la resistenza degli agenti patogeni di origine batterica al calore, MS, PEF, HHP, UV e grado di influenza. (Cebrian *et al.*, 2016).

		Heat	MS	PEF	HHP	UV
Intrinsic factors	Inter-species variation	Very large	Low	Large-very large	Large	Very low
	Intra-species variation	Large-very large	Low	Low-medium	Medium-large	Very low
Process factors	Specific	Treatment time	Amplitude de Pressure Specific energy Treatment time	Electric field Strength Pulse size/shape Specific energy Treatment time	Pressure Treatment time	Dose (J/ml)
	Temperature	Very large	Low-medium	Large	Large	Low-medium
Pre-treatment factors	Growth phase	Very large	Low	Medium-large	Large	Very low
	Growth temperature	Medium-large	Very low	Very low-low	Medium	Very low
	Prior stresses	Large	Very low	Low	Very low-low	Very low

Product parameters	pH	Large	Very low	Large	Large	Very low
	aw	Large	Low	Medium	Large	Very low
	Composition and others	Very large	Low	Medium-large	Large	Large
Recovery conditions	Sublethal injury?	Yes	No	Yes	Yes	No

Inoltre, il fatto che le differenze intra-specifiche di resistenza ad alcuni agenti (come calore o UV), potrebbero essere maggiori delle differenze inter-specifiche, implica che, come raccomandato dal comitato consultivo scientifico dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente, per la disinfezione con acqua UV (Oteiza *et al.*, 2010), i ceppi e non le specie, dovrebbero essere usati come indicatori per stabilire i criteri di processo per queste tecnologie. In alternativa, dovrebbe essere usato un cocktail di ceppi di ciascun agente patogeno.

4.2.1 Influenza dello stato fisiologico e condizioni colturali delle cellule del microrganismo sulla resistenza a MF, PEF, HHP e UV

L'influenza del tipo di microrganismo, della specie e del ceppo in esame sulla resistenza microbica alle nuove tecnologie di trasformazione alimentare, è stata ben documentata. Tuttavia, prove crescenti suggeriscono che lo stato fisiologico della cellula, potrebbe essere altrettanto importante, poiché condiziona l'espressione di meccanismi di resistenza e riparazione, e determina in tal modo il grado di resistenza di una cellula microbica.

In altre parole, ciascun ceppo, possiede un pool genetico che codifica per diversi meccanismi di resistenza, ma lo stato fisiologico delle cellule determina in modo decisivo quale di quei sistemi di resistenza saranno espressi, così come il loro grado di espressione. Tra tutti i fattori determinanti, lo stato fisiologico della fase di crescita delle cellule batteriche, è probabilmente quello che è stato più studiato. Le cellule in fase di crescita esponenziale, hanno dimostrato di essere meno resistenti alle quattro tecnologie qui studiate, rispetto a quelle in fase di crescita stazionaria (Cebrián *et al.*, 2007, 2009, 2010a, Somolinos *et al.*,

2008a; Arroyo *et al.*, 2010a, b, 2011a, 2012b; Gayán *et al.*, 2011, 2012c, 2014b, 2015).

Questo è stato dimostrato anche per il calore (Cebrián *et al.*, 2007, 2009; Arroyo *et al.*, 2009), e sia le specie Gram-positive che Gram-negative (Figura 4.2A).

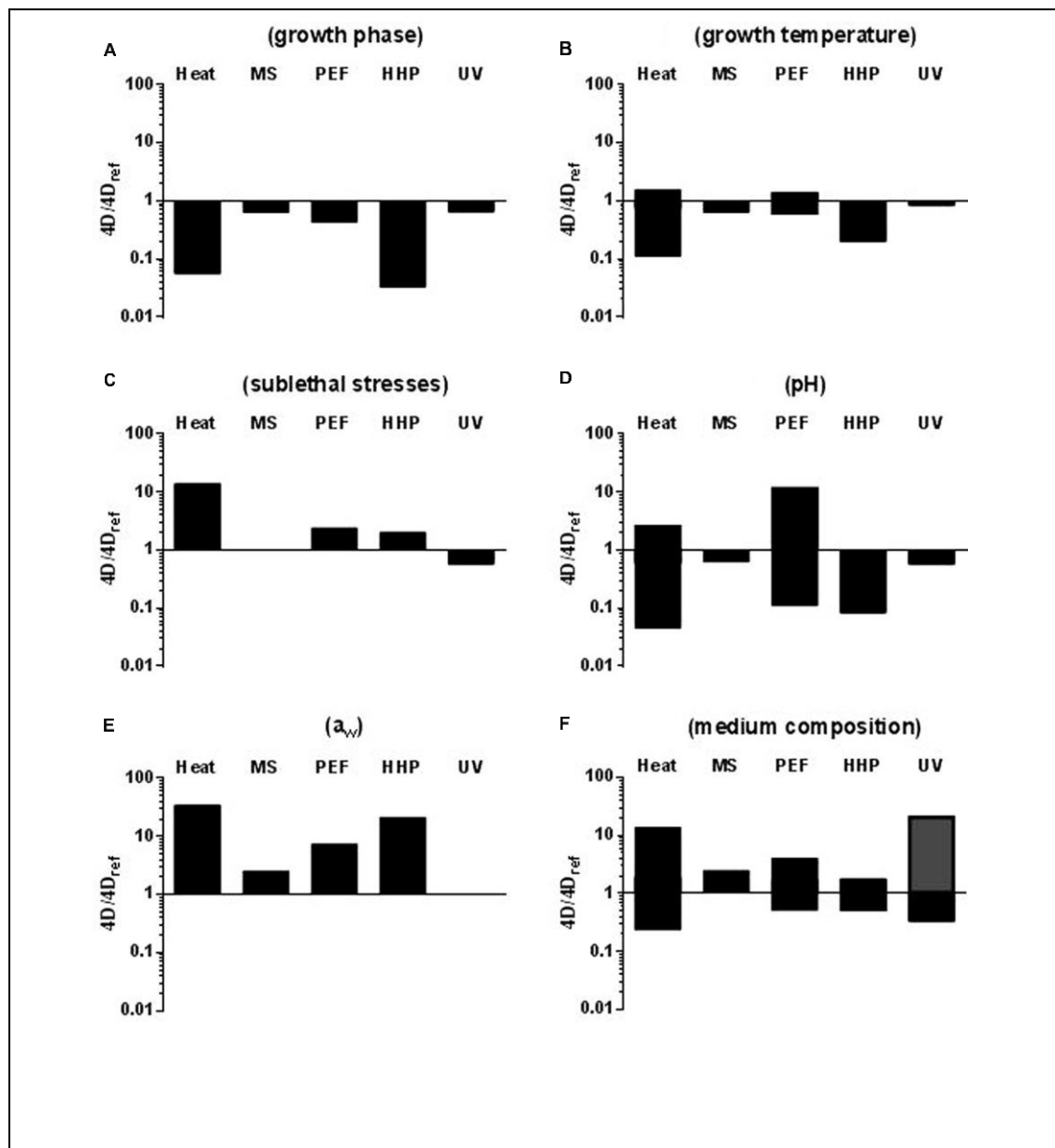


Fig. 4.2 - Influenza di diversi fattori sulla resistenza microbica al calore, MS, PEF, HHP e UV. (Cebrian *et al.*, 2016).

Tuttavia, mentre l'ingresso nella fase di crescita stazionaria non ha portato ad un aumento della resistenza a MS, UV o PEF (valori 4D) superiore a 2,3 volte per nessuno dei microrganismi indagati, si suppone un aumento della

resistenza HHP fino a 31 volte per *C. sakazakii* (Arroyo *et al.*, 2011a). Sembra quindi che, l'entità del cambiamento nella resistenza alle pressioni, determinato da un cambiamento nella fase di crescita, è maggiore delle differenze intra-e persino inter-specifiche nella resistenza.

Pertanto, ad esempio, le cellule in fase di crescita stazionaria di *E. coli* sarebbero più resistenti all'HHP, rispetto alle fasi di crescita esponenziale di *S. aureus*; questo implica che, in un prodotto contenente questi due tipi di cellule, le cellule di *E. coli* sarebbero considerate come microrganismo target. Sebbene ciò sia stato osservato in mezzi sintetici, si dovrebbe sottolineare che è molto improbabile che un tale scenario si verifichi in prodotti alimentari reali. D'altra parte, i dati accumulati sembrano indicare che l'influenza della temperatura di crescita, e della pre-esposizione a stress ambientali sulla sopravvivenza microbica a nuove tecnologie di conservazione degli alimenti, sarebbe molto inferiore a quella della fase di crescita, e ancora minore a quella del calore (Figure 4.2. B, C).

Così, ad esempio, mentre è stato trovato per *E. coli* fino ad un aumento di 10 volte in termoresistenza, in seguito all'aumento della temperatura di crescita da 10 a 42°C (Cebrián *et al.*, 2008), per *C. sakazakii* aumentando la temperatura di crescita da 10 a 37°C, ha prodotto un cambiamento di cinque volte nei valori 4DHHP (Arroyo *et al.*, 2011a). Diversamente, variare la temperatura di crescita ha un'influenza meno pronunciata sulla resistenza microbica a MS, PEF e UV. Infatti, Cebrián *et al.*, hanno rilevato al massimo una variazione di tre unità nel valore 4DPEF. (2008) per le cellule di *E. coli* mentre non sono state riscontrate differenze significative nella resistenza del PEF per *S. aureus* (Cebrián, 2009) o per *L. monocytogenes* (Álvarez *et al.*, 2002). Allo stesso modo la resistenza a MS per *L. monocytogenes* o *S. typhimurium* (Pagán *et al.*, 1999a; Condón *et al.*, 2011) o ai raggi UV per *C. sakazakii* (Arroyo *et al.*, 2012b) o *E. coli* (Gayán, 2014), è indipendente dalla temperatura di crescita. Dalle limitate informazioni disponibili sui meccanismi di risposta in grado di aumentare la sopravvivenza batterica a tecnologie non termiche come MS, PEF, HHP e UV (Cebrián *et al.*, 2012), si può concludere che l'esposizione di cellule batteriche a condizioni di stress sub-letali, capaci di

innescare meccanismi di risposta omologhi (pH acido e alcalino, perossido di idrogeno, calore osmotico e shock da freddo), hanno un effetto sulla resistenza microbica a nuove tecnologie molto inferiori a quelle riportate per i trattamenti termici (Somolinos *et al.*, 2008a; Cebrián *et al.*, 2010b, 2012; Arroyo, 2011; Arroyo *et al.*, 2012a; Gayán, 2014; Figura 4.2. C).

Per tentare di spiegare questi risultati, vale la pena menzionare che in molte specie batteriche, l'aumentata resistenza allo stress delle cellule in fase di crescita stazionaria rispetto alle cellule in fase di crescita esponenziale, è stata parzialmente attribuita all'induzione di fattori sigma generali, di stress alternativi (Abee and Wouters, 1999).

I fattori generali di stress sigma includono sigma S, noto anche come rpoS, nei batteri Gram-negativi e sigma B nei batteri Gram-positivi, che sono considerati da molti ricercatori come omologhi funzionalmente (Gertz *et al.*, 2000; Hengge-Aronis, 2000).

Secondo i dati qui riportati (Somolinos *et al.*, 2008a, 2010a; Cebrián *et al.*, 2009; Gayán *et al.*, 2014b), la delezione dei fattori sigma, ha comportato una diminuzione significativa della resistenza a tutte le tecnologie qui riportate, ma tali differenze tra i ceppi parentali e i mutanti isogenici ΔsigB o ΔrpoS erano molto più piccole per la PEF, MS e UV rispetto a calore e HHP. Questi risultati suggeriscono che la fase di crescita avrebbe un maggiore impatto sulla sopravvivenza microbica a quelle tecnologie, per le quali la risposta allo stress generale svolge un ruolo più rilevante.

Allo stesso modo, poiché lo sviluppo di risposte di resistenza incrociata è anche generalmente collegato all'induzione di queste risposte generali allo stress, è ragionevole pensare che lo sviluppo di resistenze incrociate a queste tecnologie sarebbe meno diffuso tra i batteri e avrebbe probabilmente un impatto minore. Tuttavia, va notato che sono state documentate alcune eccezioni rilevanti, come lo sviluppo della resistenza alla PEF in *S. aureus* dopo il calore e gli shock alcalini (Cebrián *et al.*, 2012), o la maggiore resistenza di *E. coli* con shock termico delle cellule a HHP (Aertsen *et al.*, 2004). D'altra parte, solo per HHP è stata osservata una relazione tra l'espressione delle proteine allo shock termico e la resistenza microbica (Aertsen *et al.*, 2004).

Il ruolo della fluidità della membrana sulla resistenza batterica a MS, PEF, HHP e UV è ancora una questione in discussione. Questi risultati potrebbero spiegare la diversa influenza che la temperatura di crescita ha sulla resistenza microbica alle quattro tecnologie qui esaminate. Vi è una quantità molto limitata di informazioni riguardanti l'effetto di altri fattori che agiscono prima del trattamento, come pH o atmosfera del mezzo di crescita.

In ogni caso, ciò che questi risultati indicano chiaramente è che, quando si determina il microrganismo target per una particolare tecnologia, si dovrebbe considerare la possibile influenza delle condizioni di crescita e dell'esposizione agli agenti stressanti sulla resistenza microbica.

4.2.2 Fattori che agiscono durante il trattamento

I fattori che agiscono durante il trattamento possono essere classificati in due gruppi:

- proprietà del mezzo
- fattori di processo

4.2.2.1 Proprietà del mezzo

Come evidenziato sopra, la resistenza microbica a qualsiasi agente di inattivazione, dipende dallo stato fisiologico della cellula. Tuttavia, essa è anche influenzata da una moltitudine di fattori ambientali che entrano in gioco nel corso del trattamento. Tra i fattori ambientali che influenzano la resistenza microbica, i più studiati sono il pH, l'attività dell'acqua e la composizione chimica del mezzo. Il pH è uno dei fattori ambientali con la maggiore influenza sulla resistenza microbica al calore (Tomlins and Ordal, 1976; Jay, 1992; Mañas *et al.*, 2003; Arroyo *et al.*, 2009), HHP (Mackey *et al.*, 1995) ; Stewart *et al.*, 1997; Alpas *et al.*, 2000; Koseki and Yamamoto, 2006; Arroyo *et al.*, 2009) e PEF (Álvarez *et al.*, 2000, 2002; Aronsson and Ronner, 2001; Geveke and Kozempel, 2003; García *et al.*, 2005a, b, 2007; Saldaña *et al.*, 2010a, b).

L'acidificazione è facilmente modificabile nei prodotti alimentari, e viene spesso applicata nell'industria alimentare. Il pH del mezzo di trattamento,

influisce raramente sulla resistenza microbica a MS e UV, al contrario di altre tecnologie.

Come mostra la figura 4.2. D, una riduzione del pH da 7.0 a 4.0, che può portare a una riduzione di 22 volte dei valori 4D per il riscaldamento e 12 volte all'HHP (Arroyo *et al.*, 2009, 2011a), riduce solo i valori 4D MS di 1,6 volte e non si traduce in cambiamento significativo dei valori 4D UV. L'influenza del pH del mezzo di trattamento sulla resistenza microbica alla PEF, ha attratto l'interesse della comunità scientifica per molti anni, poiché differisce ampiamente dal modo in cui influenza la resistenza microbica ad altre tecnologie. Pertanto, in termini generali, la riduzione del pH del mezzo di trattamento determina una diminuzione della resistenza alla PEF delle cellule Gram-positive (García *et al.*, 2005a, b, 2007; Saldaña *et al.*, 2010a). Viceversa, diminuendo il pH del mezzo di trattamento ad un valore di 5,0-5,5 si ottiene anche una diminuzione della resistenza alla PEF per le cellule Gram-negative. Ma ulteriori diminuzioni (a pH 3,5-4,0) hanno l'effetto opposto (un aumento della resistenza della PEF; García *et al.*, 2005a, b, 2007; Saldaña *et al.*, 2010b, 2012; Somolinos *et al.*, 2010b).

Quest'ultimo aumento, si osserva solo se vengono aggiunti o se sono già presenti acidi organici. Quindi, il tipo di acido presente nel mezzo è di importanza essenziale (Somolinos *et al.*, 2010b).

Questa scoperta è della massima rilevanza, dal momento che il trattamento PEF di prodotti alimentari a basso pH, come i succhi, dovrebbe essere indirizzata ai patogeni Gram-negativi. Va anche notato che, anche secondo Alpas *et al.*, (2000), la resistenza al pH acido dei ceppi di *E. coli* sarebbe paragonabile a quella di *S. aureus*, come precedentemente indicato per il pH neutro.

Data la maggiore tolleranza acida di *E. coli* e l'incapacità di *S. aureus* di sintetizzare le enterotossine a pH inferiore a 4,5 (ICMSF, 1996), *E. coli* dovrebbe essere considerato il microrganismo bersaglio per HHP in questi tipi di prodotti. Allo stato attuale, il meccanismo di sensibilizzazione batterica Gram-positiva a HHP e PEF (in questo caso solo per quanto riguarda i batteri Gram-positivi), quando trattati a bassi pH non è noto con precisione. E 'stato

suggerito, che la perdita della continuità della membrana comprometterebbe l'omeostasi del pH, che potrebbe modificare il pH intracellulare, il quale interessa i componenti principali della cellula (DNA, RNA, enzimi, ecc.; Vega-Mercado *et al.*, 1996; Pagán *et al.*, 2001).

D'altro canto, nonostante la difficoltà di immaginare quale tipo di interazione tra le molecole di acido organico e le strutture cellulari avrebbe la capacità di proteggere le cellule Gram-negative dall'azione della PEF, i dati ottenuti suggeriscono che tale interazione, avrebbe avrebbe a che fare con la membrana esterna.

Secondo Somolinos *et al.* (2010b), i meccanismi di riparazione delle cellule Gram-negative, in presenza di acidi organici a pH 4.0, o sono più efficienti, oppure le lesioni della membrana causate da PEF sono meno gravi e più facili da riparare perché in condizioni favorevoli.

Infine, se il pH del mezzo di trattamento è un fattore che ha poca o nessuna influenza sulla resistenza microbica a MS e UV, ciò può essere spiegato dai meccanismi specifici di inattivazione di queste due tecnologie. Per quanto riguarda l'influenza dell'*a_w* del mezzo di trattamento, contrariamente al pH, una riduzione della sua attività dell'acqua, di solito determina un aumento della resistenza microbica alla maggior parte delle tecnologie di conservazione degli alimenti.

Inoltre, secondo i dati pubblicati, l'attività dell'acqua è il parametro che esercita la maggiore influenza sulla resistenza microbica al calore, alla PEF e all'HHP (Figura 4.2. 2E).

Così, ad esempio, è stato dimostrato che ridurre l'attività dell'acqua nel mezzo di trattamento, può portare a un aumento di 100 volte la resistenza batterica al calore (Kwast e Verrips, 1982; Sumner *et al.*, 1991). Secondo i dati presenti in letteratura, la riduzione dell'attività dell'acqua da 0,99 a 0,96, può aumentare i valori 4D del calore di oltre 30 volte (Álvarez *et al.*, 2003b, 2006b; Arroyo *et al.*, 2009).

Lo stesso cambiamento nell'attività dell'acqua, ha portato anche a incrementi superiori a 10 volte nei valori della PEF e HHP 4D per *C. sakazakii* (Arroyo *et al.*, 2010a, 2011a), ma solo ad un aumento inferiore a tre volte nei

valori 4DMS di *S. enterica* e *C. sakazakii* (Álvarez *et al.*, 2003b, 2006b; Arroyo *et al.*, 2010b).

Questo cambiamento nell'attività dell'acqua, non influenza i valori 4DUV di nessuna delle specie studiate da Gayán *et al.* (2011, 2012b, 2012b, 2015) e Arroyo *et al.* (2012b). I meccanismi molecolari coinvolti nell'acquisizione della resistenza al calore da parte di batteri trattati, non sono ancora chiari, sebbene siano stati suggeriti i seguenti fattori: una disidratazione del citoplasma seguita da restringimento cellulare, una riduzione della dimensione dei pori ed una diminuzione della perdita di composti intracellulari (Gibson, 1973), o una stabilizzazione di proteine ed enzimi derivanti dalla formazione di legami intramolecolari (Hansen e Riemann, 1963).

È stato anche proposto, che l'interazione di trealosio con fosfolipidi di membrana, possa stabilizzare la membrana (Crowe *et al.*, 1984). Analogamente, la riduzione complessiva del volume cellulare, potrebbe anche spiegare l'aumento della resistenza alla PEF, poiché il livello di elettroporazione dipende dalla dimensione della cellula (Álvarez *et al.*, 2006a). La riduzione delle dimensioni cellulari, potrebbe anche portare ad un ispessimento della membrana cellulare, seguito da una riduzione della permeabilità e della fluidità della membrana; entrambi questi fenomeni dovrebbero aumentare la resistenza microbica alla PEF (Neidhardt *et al.*, 1990).

Meccanismi simili, sono stati proposti per spiegare l'aumento della resistenza microbica all'HHP. È stato dimostrato, che l'aumento della resistenza al calore che è stata osservata, è in parte dovuta a una stabilizzazione delle strutture cellulari contro il calore, e in parte è invece causata da una maggiore capacità di riparare i danni causati dal calore (Álvarez *et al.*, 2003b). Al contrario, l'aumento della resistenza microbica alla PEF e HHP non sembra essere correlato ad un aumento della capacità di riparare i danni sub-letali (Arroyo *et al.*, 2010a, 2011a).

Poiché l'inattivazione microbica da parte della MS a basse attività dell'acqua, è un evento "tutto o niente", ciò potrebbe in parte spiegare l'influenza relativamente bassa del fattore, sulla resistenza alla MS. Infine, come indicato in precedenza per il pH, sembra logico che la riduzione

dell'attività dell'acqua, in media, non abbia un'influenza sulla resistenza microbica all'UV, data la specifica modalità di azione di questo agente sul DNA.

È stato dimostrato che l'effetto protettivo dell'attività dell'acqua del mezzo, sull'inattivazione microbica da parte di HHP e PEF, dipende anche dal soluto aggiunto. Pertanto, allo stesso livello di attività dell'acqua, le cellule microbiche tendono ad essere più sensibili alla pressione in glicerolo, rispetto ai monosaccaridi e ai disaccaridi (Patterson, 2005).

Allo stesso modo, il sale è generalmente meno protettivo contro l'HHP rispetto ai carboidrati (Smelt, 1998). Per quanto riguarda la PEF, è stato riportato che i microrganismi sono più sensibili alla PEF, quando il glicerolo viene aggiunto al mezzo di trattamento rispetto a quando il soluto aggiunto è il saccarosio (Álvarez *et al.*, 2006a). È noto che la resistenza microbica alla maggior parte delle tecnologie, cambia con la composizione del mezzo di trattamento (Tomlins and Ordal, 1976; Hülshager *et al.*, 1981; Patterson *et al.*, 1995; Grahl and Märkl, 1996; Simpson and Gilmour, 1997; Hauben *et al.*, 1998; Mañas *et al.*, 2001a, b; Gayán *et al.*, 2014). Sebbene, come sopra riportato, sia stato suggerito che questi cambiamenti nella resistenza potrebbero essere dovuti al pH e / o alle differenze di attività dell'acqua, molti autori hanno dimostrato che i microrganismi possono mostrare un diverso grado di resistenza al calore, alla PEF e all'HHP, in diversi tipi di mezzi che presentano lo stesso pH e / o a_w (Baird-Parker *et al.*, 1970; Corry, 1974; Hülshager *et al.*, 1981; Condón and Sala, 1992; Patterson *et al.*, 1995; Grahl and Märkl, 1996; Simpson and Gilmour, 1997 ; Hauben *et al.*, 1998; Mañas *et al.*, 2001b).

Si potrebbe quindi concludere, che alcuni componenti chimici, indipendentemente dal pH e dall'attività dell'acqua, potrebbero proteggere le cellule batteriche dalle diverse tecnologie di conservazione degli alimenti. In alcune occasioni, tuttavia, è stato osservato anche l'effetto opposto (Arroyo *et al.*, 2011a; Gayán, 2014; Serrano, 2016). La figura 4.2. F, illustra l'influenza massima della composizione del mezzo, sulla resistenza microbica a calore, MS, PEF, HHP e UV.

Per elaborare questa figura, sono stati confrontati i valori 4D ottenuti per diversi microrganismi sospesi in diversi prodotti alimentari, ed esposti alle quattro tecnologie in tampone di pH (e di un pH simili (se non uguali). Pertanto, i cambiamenti nella resistenza microbica qui riportati, sarebbero dovuti alla composizione specifica del prodotto alimentare e non possono essere attribuiti al suo pH o aw.

Secondo questi dati, l'influenza della composizione media sulla resistenza microbica a MS, PEF e HHP è molto inferiore rispetto al calore. Pertanto, la resistenza alla MS cambia a malapena nei substrati di laboratorio, e negli alimenti liquidi come latte, succhi, minestre di verdura e uovo intero liquido (Mañas *et al.*, 2000b; Arroyo *et al.*, 2010b, 2011b, c; Condón *et al.*, 2011). Allo stesso modo, la resistenza microbica a HHP, difficilmente aumenta di tre volte (Arroyo *et al.*, 2010a).

Va notato, che altri autori hanno riportato maggiori differenze nella resistenza a HHP, a causa di cambiamenti nella composizione del mezzo (Patterson, 2005).

Al contrario, per *C. sakazakii* è stato segnalato un aumento della resistenza al calore, pari a 14 volte quando trattato con succo di mela, rispetto ad un tampone dello stesso pH e aw (Arroyo *et al.*, 2009). Sono stati anche documentati gli effetti protettivi contro il calore di diversi prodotti alimentari, come uovo liquido, latte, succhi e zuppe di verdure (Mañas *et al.*, 2000b, 2001b; Arroyo *et al.*, 2009; Serrano, 2016).

Il caso degli UV è piuttosto particolare. Infatti, fattori diversi dalle proprietà ottiche del mezzo, hanno un'influenza molto bassa sulla resistenza microbica (Gayán *et al.*, 2014a).

Viceversa, come sottolineato da Koutchma *et al.* (2009), le caratteristiche del prodotto più influenti, legate all'efficacia letale delle tecnologie UV, sono le proprietà ottiche, principalmente l'assorbanza UV e la torbidità del mezzo. Pertanto, componenti di colore, composti solubili e solidi sospesi, possono assorbire, riflettere e disperdere la luce accidentale, riducendo così il numero di fotoni disponibili per uccidere i microrganismi (Koutchma *et al.*, 2009). Secondo Gayán *et al.* (2011), un aumento nell'assorbanza della matrice di 15,92

cm⁻¹, porta ad un aumento di 10 volte dei valori 4D per *E. coli*. Risultati simili, sono stati ottenuti per altri microrganismi (Gayán *et al.*, 2012c, 2014b, 2015). Allo stato attuale, i meccanismi coinvolti in questi aumenti e / o diminuzioni nella resistenza microbica, non sono noti con precisione.

Il latte è uno dei pochi prodotti per cui il meccanismo sottostante, che porta al cambiamento di resistenza, è stato studiato in profondità. Pertanto, è stato proposto che l'aumentata resistenza microbica a PEF e HHP, quando trattata nel latte, sia probabilmente dovuta all'effetto di stabilizzazione dei cationi bivalenti sulle membrane cellulari (Hauben *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2006a).

4.2.2.2 Fattori di processo

Poiché la maggior parte dei fattori di processo (elencati nella Tabella 4.2) sono specifici per ciascuna tecnologia, non possono essere sempre confrontati. Pertanto, in questo senso l'unico fattore confrontabile è la temperatura di trattamento. Sebbene tutte le nuove tecnologie qui recensite siano considerate non termiche, vari autori hanno proposto di combinarle con temperature sub-letali o addirittura letali, per aumentare la letalità complessiva del processo (Sala *et al.*, 1992; Patterson and Kilpatrick, 1998; Raso *et al.*, 1998d, e; Heinz *et al.*, 2003; Raso and Barbosa-Cánovas, 2003; Leadley, 2005; Patterson, 2005; Álvarez *et al.*, 2006a; López-Pedemonte *et al.*, 2006; Saldaña *et al.*, 2010c, 2012; Gayán *et al.*, 2011, 2012a, b, c, 2014b, 2015).

Una combinazione con temperature sub-letali, ha dimostrato di migliorare l'effetto letale della MS (Sala *et al.*, 1992, Raso *et al.*, 1998d, e Pagán *et al.*, 1999a, b, c; Arroyo *et al.*, 2011b, c), della PEF (Álvarez *et al.*, 2006a; Cebrián, 2009; Saldaña *et al.*, 2010c, 2012) e di UV-C (Gayán *et al.*, 2011, 2012a, b, c, 2014b, 2015; Arroyo *et al.*, 2012b).

La temperatura del trattamento, può anche avere un effetto significativo sulla resistenza microbica all'HHP. Pertanto, al di sopra di una particolare soglia di temperatura, l'aumento della temperatura di trattamento porta anche ad un aumento della letalità HHP (Patterson, 2005; Ramos, 2016).

Quindi l'applicazione combinata di queste nuove tecnologie con temperature moderate, sembra essere una delle alternative più interessanti per lo sviluppo di processi combinati, poiché come si può osservare nella figura 4.3., un aumento della temperatura di trattamento dalla temperatura ambiente a 55°C porta a significative diminuzioni nei valori 4D, nel caso di tutte e quattro le tecnologie, inclusa una riduzione di > 10 volte per PEF e HHP (Figura 4.3).

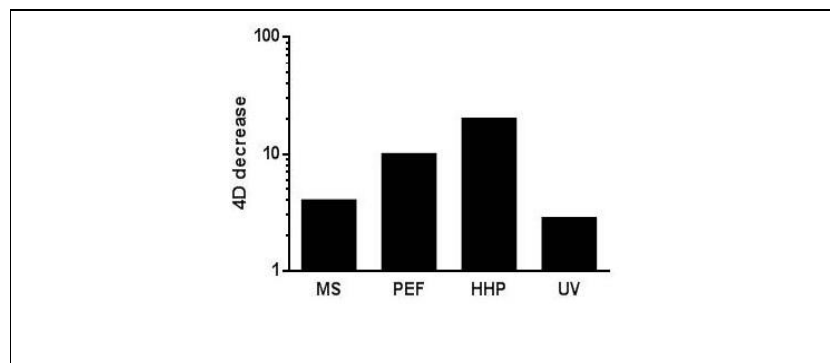


Figura 4.3 – Influenza di un aumento della temperatura di trattamento sui valori 4D calcolati per le diverse tecnologie esaminate. (Cebrian et al., 2016).

Va notato, che la maggior parte dei dati riportati, sembra indicare che l'entità dell'aumento della letalità, aumentando la temperatura di trattamento, sembra essere maggiore per PEF e HHP, che per MS e UV. Questi risultati sono in accordo con un'ulteriore constatazione: considerando che gli aumenti di temperatura entro il range fisiologico (ad esempio, da 25 a 40°C) hanno dimostrato di aumentare la letalità della PEF e HHP, temperature più elevate (vicino a 50°C o addirittura superiore) sono necessarie per indurre una significativa riduzione della resistenza microbica alla MS e agli UV (Raso *et al.*, 1998d, e Pagán *et al.*, 1999a, b, c; Tassou *et al.*, 2008; Cebrián, 2009; Saldaña *et al.*, 2010c; Arroyo *et al.*, 2011b, c; Gayán *et al.*, 2011, 2012a, b, c, 2014b, 2015).

Secondo la maggior parte degli autori, l'aumentata sensibilità delle cellule batteriche a MS, PEF e HHP, quando trattate a temperature sub-letali, sarebbe probabilmente dovuta a determinati cambiamenti indotti dalla temperatura all'interno degli involucri cellulari, che potrebbero renderli più vulnerabili alle sollecitazioni meccaniche (Sonoike *et al.*, 1992; Pagán *et al.*, 1999b; Álvarez *et al.*, 2006a). Pertanto, è stato ipotizzato che la fluidizzazione a membrana delle

membrane batteriche, li renderebbe più sensibili a queste tre tecnologie (Stanley, 1991; Casadei *et al.*, 2002; Condón *et al.*, 2005). Tuttavia, alcuni ricercatori hanno sottolineato che la sola fluidificazione, non può spiegare adeguatamente tutti i risultati riportati, e che altri fattori devono svolgere un ruolo nella sensibilizzazione dipendente dalla temperatura delle cellule batteriche a MS, HHP e PEF (Casadei *et al.*, 2002; Condón *et al.*, 2005; Cebrián, 2009).

Per quanto riguarda i raggi UV, Gayán *et al.* (2013b) hanno suggerito che l'effetto sinergico letale dei trattamenti UV-H, sarebbe dovuto all'inibizione della riparazione della perdita del DNA, derivante dalla fluidificazione della membrana causata dal riscaldamento simultaneo (Gayán *et al.*, 2013b).

4.2.2.3 Fattori che agiscono dopo il trattamento

Le condizioni di recupero, sono generalmente riconosciute come uno dei fattori chiave della sopravvivenza microbica, in seguito all'esposizione ad un agente letale (Mañas e Pagán, 2005).

Come ha descritto Mackey (2000), i microrganismi sopravvissuti all'azione letale degli agenti di conservazione, possono subire lesioni sub-letali. Ciò significa che potrebbero essere in grado di riparare i danni, ma solo se le condizioni ambientali sono adatte. Quindi, il numero finale di cellule microbiche vitali, dopo un particolare trattamento, sarebbe altamente condizionato dalle condizioni di recupero, almeno per quelle tecnologie che producono lesioni sub-letali nelle cellule. Come sottolineato da Mañas e Pagán (2005), il verificarsi di lesioni sub-letali, ha due conseguenze principali. Innanzitutto, siccome le cellule danneggiate potrebbero non essere rilevate quando si utilizzano condizioni selettive per numerare i sopravvissuti, una scelta inadeguata delle condizioni di recupero può portare ad una sovrastima della letalità del trattamento.

In secondo luogo, se la riparazione viene adeguatamente prevenuta, la cellula potrebbe non essere in grado di superare i danni e il livello di inattivazione raggiunto potrebbe quindi essere più elevato. Ciò apre la possibilità di sviluppare nuovi processi combinati, basati sull'uso di queste

tecnologie, in combinazione con ulteriori agenti di conservazione (ostacoli) in grado di interferire con il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Tutte le tecnologie qui esaminate, ad eccezione di MS, portano alla comparsa di cellule danneggiate (Pagán *et al.*, 1999b; García *et al.*, 2005a, b, 2007; Somolinos *et al.*, 2008a, b, 2010a; Cebrián *et al.*, 2009, 2010a; Arroyo *et al.*, 2010a, b, 2011a, b; Saldaña *et al.*, 2010a, b, c; Gayán *et al.*, 2013b). Tuttavia, dato che i meccanismi d'azione di queste tecnologie differiscono in modo abbastanza radicale, i tipi di danno procurato, variano notevolmente. Inoltre, i fattori esaminati sopra, tra cui il tipo di microrganismo, il suo stato fisiologico e le condizioni di trattamento, determinano anche i tipi e la gravità delle lesioni provocate.

Di conseguenza, la proporzione di cellule che hanno subito danni sub-letali dopo il trattamento, varia molto a seconda dell'agente, del microrganismo e delle condizioni di trattamento.

Sono stati osservati danni sub-letali alla membrana citoplasmatica in seguito all'esposizione microbica a PEF e HHP (García *et al.*, 2005a, b, 2007; Somolinos *et al.*, 2008a, b, 2010a; Cebrián *et al.*, 2009, 2010a; Arroyo *et al.*, 2010a, 2011a; Saldaña *et al.*, 2010a, b, c).

Allo stesso modo, i danni sub-letali alla membrana esterna, sono stati documentati dopo aver esposto cellule microbiche a HHP e, occasionalmente, a PEF (Somolinos *et al.*, 2008b; Arroyo *et al.*, 2010a, 2011a). Al contrario, i danni sub-letali ossidativi, sono stati rilevati dopo i trattamenti HHP (Aertsen *et al.*, 2004; Cebrián *et al.*, 2010a) ma non dopo PEF. Sono comunque ancora necessari ulteriori studi per caratterizzare pienamente il modo in cui per un certo tipo di microrganismo, il suo stato fisiologico e le condizioni di trattamento determinano la proporzione di cellule che hanno subito danni sub-letali dopo un trattamento. Tuttavia, dai dati ad oggi disponibili possiamo concludere che, la percentuale di cellule che hanno subito danni sub-letali dopo la PEF e i trattamenti HHP, sembra essere più elevata per le cellule in fase stazionaria, che per quelle esponenziali (Somolinos *et al.*, 2008a, b; Cebrián *et al.*, 2009, 2010a).

Per quanto riguarda la PEF, la proporzione di cellule sub-letalmente danneggiate, si è dimostrata maggiore quando trattata a pH 7,0 rispetto a pH 4,0 per le cellule Gram-positive e l'opposto si applica alle cellule Gram-negative (García *et al.*, 2005a, b, 2007; Arroyo *et al.*, 2010a; Saldaña *et al.*, 2010a, b). Infine, l'aumento della resistenza microbica alla PEF, determinato diminuendo l'aw del mezzo, non sembra avere alcuna connessione con una variazione nella proporzione delle cellule che hanno subito danni sub-letali (Arroyo *et al.*, 2010a). Inoltre, sono stati ottenuti risultati contraddittori riguardo la proporzione di cellule sottoposte a sublimazione dopo trattamenti HHP a diversi livelli di pH: Condón *et al.* (2011), hanno riportato che la proporzione di cellule di *S. aureus* che hanno subito danni sub-letali, era inferiore a pH acido rispetto a pH neutro, ma nessuna differenza in tali proporzioni è stata trovata da Arroyo *et al.* (2011a). Sebbene i dati siano molto scarsi, l'aumento della resistenza microbica all'HHP, causato dalla diminuzione del terreno del mezzo, come nella PEF, non sembra essere correlato ad un cambiamento nella proporzione delle cellule che hanno subito danni sub-letali (Arroyo *et al.*, 2011a). Tra tutti questi scenari, quelli più rilevanti sono quelli in cui l'aumento della resistenza microbica è associato alla comparsa di un aumento della proporzione di cellule che hanno subito danni sub-letali (ad esempio, l'inattivazione dei Gram-negativi da PEF nei terreni acidi), poiché esse aprono la possibilità di sviluppare processi combinati in grado di inattivare i microrganismi in circostanze che non potrebbero essere prodotte dalla sola tecnologia. Sono state descritte molte combinazioni di HHP e PEF con diversi agenti come lisozima, nisina, pediocina AcH, latticina, lattoferrina, lattoferricina, EDTA, trietile citrato, oli essenziali, citrale, carvacrolo o limonene, il che porta ad un aumento dell'inattivazione microbica (Kalchayanand *et al.*, 1994; Hauben *et al.*, 1998; Somolinos *et al.*, 2008a; Arroyo *et al.*, 2010c; Monfort *et al.*, 2012; Saldaña *et al.*, 2012; Espina *et al.*, 2013, 2014).

Vale anche la pena ricordare, che è stata proposta un'altra procedura per ottenere l'inattivazione delle cellule che hanno subito danni sub-letali causati da HHP e PEF; vale a dire, il successivo immagazzinamento delle cellule in un

mezzo acido, a temperature di refrigerazione (García *et al.*, 2005c; Somolinos *et al.*, 2008a).

Questa procedura è di particolare interesse nel campo della lavorazione del succo pastorizzato, poiché non richiederebbe l'aggiunta di alcun passaggio o additivo aggiuntivo dopo il trattamento HHP o PEF. Sviluppare una procedura combinata con UV, basata sullo stesso principio, sembra inizialmente più complessa, poiché tale procedura dovrebbe essere basata sulla prevenzione dei meccanismi di riparazione del DNA sia dipendenti dalla luce che indipendenti dalla luce (Gayán *et al.*, 2013a).

A questo proposito, impedire l'esposizione delle cellule trattate, alla luce visibile, potrebbe rappresentare un'alternativa. Tuttavia, la sua efficacia sembra variare ampiamente a seconda del tipo di microrganismi (Gayán, 2014). D'altra parte, come spiegato sopra, Gayán *et al.* (2013b), hanno dimostrato che l'aumentata letalità dei trattamenti UV, quando applicati a temperature sub-letali, è dovuta alla ridotta capacità delle cellule microbiche di riparare il DNA, causata dalla fluidificazione delle membrane.

Pertanto, questo processo combinato, illustra ancora una volta come la prevenzione della riparazione dei danni microbici potrebbe aumentare l'efficacia dei trattamenti che comportano nuove tecnologie di conservazione.

Considerazioni finali

È disponibile un'ampia quantità di dati sulla resistenza a trattamenti non termici di diverse specie microbiche, rilevanti per la sicurezza e la stabilità alimentare. Tuttavia, diversi tipi di apparecchiature, matrici e condizioni sperimentali applicate in numerosi studi e / o laboratori (ad esempio lo stato fisiologico dei microrganismi, i diversi parametri di trattamento e le condizioni di recupero), rendono difficile classificare la resistenza relativa di diverse specie microbiche a ciascuna di queste tecnologie, e quasi impossibile stabilire raffronti significativi tra questi ultimi. L'applicazione di campi elettrici moderati nella tecnologia alimentare ha attirato grande attenzione nell'ultimo decennio, ma ancora poche informazioni sono disponibili sulla cinetica di variazione della permeabilità della membrana e sui cambiamenti reversibili e irreversibili della

struttura delle cellule nei sistemi alimentari reali durante e dopo l'applicazione della PEF.

Tuttavia, anche se diversi aspetti del processo di trattamento del PEF devono essere ulteriormente studiati, questa tecnologia è diventata un metodo ampiamente utilizzato equivalente alla pastorizzazione del calore. Pertanto dovrebbero essere approfonditi aspetti riguardanti l'ottimizzazione delle condizioni del processo della PEF, la comprensione del destino e della sopravvivenza dei SIC e la combinazione della PEF con altre tecnologie di inattivazione al fine di massimizzare l'inattivazione.

Inoltre l'applicazione di sistemi combinati basati su tecnologie non termiche, termiche e utilizzo di antimicrobici, rappresenta senz'altro un approccio con forti potenzialità per garantire la sicurezza e qualità nutrizionale degli alimenti trattati per i consumatori. Oggi ci sono diverse aziende PEF disponibili nel mondo. Tuttavia, l'adozione della tecnologia per l'inattivazione microbica e la disponibilità commerciale, sono ancora limitate. Il costo dell'investimento iniziale dei sistemi PEF è elevato e il divario tra le potenzialità innovative e la loro applicazione rimane ancora una sfida (Stoica *et al.*, 2013).

Tuttavia, la PEF ha trovato spazio per applicazioni diverse, dall'inattivazione microbica e l'aumento della resa nell'industria dei succhi, all'aumentare la resa nei processi di estrazione oppure per modificare la consistenza dei prodotti per ridurre le perdite a valle o infine per ammorbidire il tessuto di patate per la produzione di patatine fritte.

Bibliografía

- Abee, T., and Wouters, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 65–91. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00078-1
- Aertsen, A., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P., Sermon, J., Hauben, K., Farewell, A., *et al.* (2004). Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2660–2666. doi: 10.1128/AEM.70.5.2660-2666.2004
- Aguilo-Aguayo, Abreu, Hossain, Altisent, Brunton, Vin~as, Rai, 2015. Exploring the effects of pulsed electric field processing parameters on polyacetylene extraction from carrot slices. *Molecules* 20 (3), 3942e3954.
- Altuntas, J., Evrendilek, G. A., Sangun, M. K., & Zhang, H. Q. (2010). Effects of pulsed electric field processing on the quality and microbial inactivation of sour cherry juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 899e905.
- Álvarez, I., Condón, S., and Raso, J. (2006a). “Microbial inactivation by pulsed electric fields,” in *Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry*, eds J. Raso and V. Heinz (New York, NY: Springer Applied Science), 95–128.
- Álvarez, I., Condón, S., Sala, F. J., and Raso, J. (2003a). Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *J. Food Sci.* 68, 2316–2320. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05765.x
- Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., and Raso, J. (2003c). The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 87–95. doi: 10.1016/S0168-1605(03) 00056-4
- Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J., and Condón, S. (2002). Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 489–493. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002. 01221.x
- Álvarez, I., Raso, J., Palop, A., and Sala, F. J.(2000). Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 143–146. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00173-2

- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J., and Condón, S. (2003d). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiol.* 20, 691–700. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00033-9
- Álvarez, I., Virto, R., Raso, J., and Condón, S. (2003e). Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 195–202. doi: 10.1016/S1466-8564(03)00004-3
- Amiali, M., & Ngadi, M. O. (2012). 14-Microbial decontamination of food by pulsed electric fields (PEFs). In A. Demirci, & M. O. Ngadi (Eds.), *Microbial decontamination in the food industry: Novel methods and applications* (pp. 407e449). Woodhead Publishing.
- Andre, F.M., Rassokhin, M.A., Bowman, A.M., Pakhomov, A.G., 2010. Gadolinium blocks membrane permeabilization induced by nanosecond electric pulses and reduces cell death. *Bioelectrochemistry* 79 (1), 95e100.
- Andre, F.M., Rassokhin, M.A., Bowman, A.M., Pakhomov, A.G., 2010. Gadolinium blocks membrane permeabilization induced by nanosecond electric pulses and reduces cell death. *Bioelectrochemistry* 79 (1), 95e100.
- Angesch, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2000). Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 135e149.
- Arroyo, C., Cebrian, G., Condon, S., Pagan, R., 2012. Development of resistance in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to thermal and nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions. *J. Appl. Microbiol.* 112 (3), 561e570.
- Arroyo, C., Cebrián, G., Mackey, B. M., Condón, S., and Pagán, R. (2011a). Environmental factors influencing the inactivation of *Cronobacter sakazakii* by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 134–143. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.018
- Arroyo, C., Cebrián, G., Pagán, R., and Condón, S. (2010a). Resistance of *Enterobacter sakazakii* to pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 283–289. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05218.x
- Arroyo, C., Cebrián, G., Pagan, R., and Condón, S. (2010b). Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 446–454. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.033

- Arroyo, C., Condón, S., and Pagán, R. (2009). Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 110–118. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.013
- Arroyo, C., Gayán, E., Pagán, R., and Condón, S. (2012b). UV-C inactivation of *Cronobacter sakazakii*. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 907–914. doi: 10.1089/fpd.2012.1178
- Arroyo, C., Somolinos, M., Cebrian, G., Condon, S., Pagan, R., 2010. Pulsed electric fields cause sublethal injuries in the outer membrane of *Enterobacter sakazakii* facilitating the antimicrobial activity of citral. *Lett. Appl. Microbiol.* 51 (5), 525e531.
- Balasa, A., Toepfl, S., & Knorr, D. (2006). Pulsed electric field treatment of grapes. *Food Factory of the Future 3*, Gothenburg, Sweden.
- Bansal, V., Sharma, A., Ghanshyam, C., Singla, M.L., Kim, K.H., 2015. Influence of pulsed electric field and heat treatment on *Emblica officinalis* juice inoculated with *Zygosaccharomyces bailii*. *Food & Bioprod. Process.* 95, 146e154.
- Barba, F.J., Galanakis, C.M., Esteve, M.J., Frigola, A., Vorobiev, E., 2015. Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high added value compounds from blackberries. *J. Food Eng.* 167, 38e44.
- Beebe, S.J., White, J., Blackmore, P.F., Deng, Y., Somers, K., Schoenbach, K.H., 2003. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *Dna Cell Biol.* 22 (12), 785e796.
- Benbettaieb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.H., Debeaufort, F., 2016. Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chem.* 195, 11e18.
- Bermúdez-Aguirre, D., Dunne, C. P., & Barbosa-Canovas, G. V. (2012). Effect of processing parameters on inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk using pulsed electric fields. *International Dairy Journal*, 24, 13e21.
- Bermúdez-Aguirre, D., Dunne, C.P., Barbosa-Canovas, G.V., 2009. Effect of processing parameters on inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk using pulsed electric fields. *Int. Dairy J.* 19 (4), 13e21.
- Bisconsin Junior, A., Alvarenga, J.F.R., Rosenthal, A., Monteiro, M., 2015. Effect of high hydrostatic pressure on ascorbic acid, phenolic compounds and antioxidant activity of Pera Rio orange juice. *J. Food Process. Technol.* 6, 416e422.
- Bornhorst, E.R., Tang, J., Sablani, S.S., Barbosa-Canovas, G.V., 2017. Thermal pasteurization process evaluation using mashed potato model

food with Maillard reaction products. *LWT - Food Sci. Technol.* 82, 454e463.

- Boye, J.I., Arcand, Y., 2013. Current trends in green technologies in food production and processing. *Food Eng. Rev.* 5 (1), 1e17.
- Caminiti, I. M., Palgan, I., Noci, F., Muñoz, A., Whyte, P., Cronin, D. A., *et al.* (2011). The effect of pulsed electric fields (PEF) in combination with high intensity light pulses (HILP) on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 118e123.
- Cebrián, G. (2009). *Mecanismos de Inactivación y Resistencia de Staphylococcus aureus a Diferentes Procesos de Conservación de los Alimentos*, Doctoral Thesis, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Cebrián, G., Michiels, C. W., Mañas, P., and Condón, S. (2010a). Biological approach to modeling of *Staphylococcus aureus* high-hydrostatic-pressure inactivation kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6982–6990. doi: 10.1128/AEM.00900-10
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., and Mañas, P. (2008). Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 105, 271–278. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03745.x
- Cebrian, G., Sagarzazu, N., Pagan, R., Condon, S., Man~as, P., 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *Int. J. Food Microbiol.* 118 (3), 304e311.
- Cheftel, C. (1995). Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* 1, 75–90. doi:
- Chen, Y., Yu, L. J., & Rupasinghe, H. P. (2013). Effect of thermal and nonthermal pasteurisation on the microbial inactivation and phenolic degradation in fruit juice: A mini-review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 981e986.
- Clark, J. P. (2006). Pulsed electric field processing. *Food Technology*, 60, 66e67.
- Cole, D.M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D., Kilsby, D.C., 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J. Ind. Microbiol.* 12 (3e5), 232e239.
- Condón, S., Mañas, P., and Cebrián, G. (2011). “Manothermosonication for microbial inactivation,” in *Ultrasound*

Technologies for Food and Bioprocessing, eds H. Feng, J. Weiss, and G. Barbosa-Cánovas (New York, NY: Springer), 287–319.

- Crowe, J. H., Crowe, L. M., and Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223, 701–703. doi: 10.1126/science.223.4637.701
- Dörnenburg, H., & Knorr, D. (1993). Cellular permeabilisation of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnology*, 7(1), 35e48.
- Dutreux, N., Notermans, S., Gongoranieto, M.M., Barbosacanovas, G.V., Swanson, B.G., 2000. Effects of combined exposure of micrococcus luteus to nisin and pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 60 (2), 147e152.
- Effectiveness of combined Pulsed Electric Field (PEF) and Manothermosonication (MTS) for the control of *Listeria innocua* in a smoothie type beverage. *Food Control* 25 (2), 621e625.
- Escott, C., Vaquero, C., Fresno, J.M.D., Ban~uelos, M.A., Loira, I., Han, S.Y., Bi, Y., Morata, A., Suarez-Lepe, J.A., 2017. Pulsed light effect in red grape quality and fermentation. *Food & Bioprocess Technol.* (10), 1e8.
- Espina, L., Monfort, S., Álvarez, I., García-Gonzalo, D., and Pagán, R. (2014). Combination of pulsed electric fields, mild heat and essential oils as an alternative to the ultrapasteurization of liquid whole egg. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 119–125. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.002
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J.A., Ramalhosa, E., Saraiva, J.A., 2017. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatment on edible flowers' properties. *Food & Bioprocess Technol.* 10 (5), 799e807.
- Fincan, M., DeVito, F., & Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment.
- Frozi, J.B., Domingues, J.R., Esper, L.M.R., Rosa, J.M.C.D., Silva, A.L.S.D.C., Gonzalez, A.G.M., 2015. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in Minas frescal cheese. *Food Sci. Technol.* 35 (1).
- García, D., Gomez, N., Condon, S., Raso, J., Pagan, R., 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36 (3), 140e144.
- García, D., Gomez, N., Man~as, P., Condon, S., Raso, J., Pa gan, R., 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium ph and the

intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Microbiol.* 99 (1), 94e104.

- García, D., Gomez, N., Man~as, P., Raso, J., Pagan, R., 2007. Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *Int. J. Food Microbiol.* 113 (2), 219e227.
- García, D., Man~as, P., Gomez, N., Raso, J., Pa gan, R., 2006. Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *J. Appl. Microbiol.* 100 (3), 428e435.
- Gayán, E. (2014). *Desarrollo de Procesos Combinados de Higienización de los Alimentos Basados en la Aplicación de luz UV y Calor* Doctoral Thesis, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Gayán, E., Condón, S., and Álvarez, I. (2014a). Biological aspects in food preservation by ultraviolet lighth: a review. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1–20. doi: 10.1007/s11947-013-1168-7
- Gayán, E., Serrano, M. J., Pagán, R., Álvarez, I., and Condón, S. (2015). Environmental and biological factors influencing the UV-C resistance of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 46, 246–253. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.011
- Geveke, D. J. (2008). UV inactivation of *E. coli* in liquid egg white. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 201e206.
- Gibson, B. (1973). The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 36, 365–376. doi: 10.1111/j.13652672.1973.tb04118.x
- Giner, J., Rauret-Arino, A., Barbosa-Canovas, G. V., & Martin-Belloso, O. (1997). Inactivation of polyphenoloxidase by pulsed electric fields. In Proceedings IFT Annual meeting, p. 19, Orlando, USA.
- Gomes, B.C., Franco, B.D., De Martinis, E.C., 2013. Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. *Foodborne Pathogens Dis.* 10 (3), 197e205.
- Gomes, W.F., Tiwari, B.K., Rodriguez, O., Brito, E.S.D., Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S., 2017. Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. *Food Chem.* 218, 261e268.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Condón, S., and Raso, J. (2005). Modeling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 199–206. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.033

- Gonzalez, M.E., Barrett, D.M., 2010. Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *J. Food Sci.* 75 (7), 121e130.
- Guderjan, M., Toepfl, S., Angersbach, A., & Knorr, D. (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering*, 67(3), 281e287.
- Hamilton, W.A., Sale, A.J.H., 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *BBA - General Subj.* 148 (3), 789e800.
- Hansen, N. H., and Riemann, H. (1963). Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 26, 314–333. doi: 10.1111/j.13652672.1963.tb04783.x
- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., & Knorr, D. (2002). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 103e111.
- Hengge-Aronis, R. (2000). “The general stress response in *Escherichia coli*,” in *Bacterial Stress Responses*, eds G. Storz and R. Hengge-Aronis (Washington DC: ASM Press), 161–178.
- Hertwig, C., Steins, V., Reineke, K., Rademacher, A., Klocke, M., Rauh, C., Schlüter, O., 2015. Impact of surface structure and feed gas composition on *Bacillus subtilis* endospore inactivation during direct plasma treatment. *Front. Microbiol.* 6 (1), 774.
- Hülshager, H., Potel, J., Niemann, E.G., 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 22 (2), 149e162.
- Jaeger, H., Schulz, A., Karapetkov, N., Knorr, D., Strachan, N., Devlieghere, F., Ogden, I., 2009. Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *Int. J. Food Microbiol.* 134 (1e2), 154e161.
- Jay, J.M., 1998. *High-temperature Food Preservation and Characteristics of Thermophilic Microorganisms*. Springer US.
- Jia, M., Zhang, H. Q., & Min, D. B. (1999). Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chemistry*, 65(4), 445e451.
Journal of Food Engineering, 52, 185e192.
Journal of Food Engineering, 64, 381e388.
- Kang, H., Tian, H., Ling, G., Wang, J., 2012. A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing. *J. Food Eng.* 111 (2), 191e207.

- Khadre, M. A., and Yousef, A. E. (2002). Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure, and pulsed electric field. *J. Food Prot.* 65, 1441-1446.
- Kingsley, D. H., Hoover, D., Papafragkou, E., and Richards, G. P. (2002). Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 65, 1605–1609.
- Koubaa, M., Barba, F.J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Boussetta, N., Vorobiev, E., 2016. Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 37, 336e344.
- Koutchma, T., Forney, L. J., and Moraru, C. L. (2009). *Ultraviolet Light in Food Technology*. Boca Raton: CRC Press.
- Kuldiloke, J., & Eshtiaghi, M. N. (2008). Application of nonthermal processing for preservation of orange juice. *KMITL Science Technology Journal*, 8, 64e74.
- Li, C., Yao, C., Qin, Y., Mi, Y., 2010. Experimental studies on effects of sub-lethal dose of pulsed electric field on Hela cells. In: *Power Modulator and High Voltage Conference*, pp. 704e706.
- Li, M., Lin, J., Chen, J., Fang, T., 2016. Pulsed electric field-assisted enzymatic extraction of protein from Abalone (*Haliotis Discus Hannai* ino) Viscera. *J. Food Process Eng.* 39 (6), 702e710.
- Li, X., & Farid, M. (2016). A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. *Journal of Food Engineering*, 182, 33e45.
- Liu, Z.W., Zeng, X.A., Ngadi, M., Han, Z., 2017. Effect of cell membrane fatty acid composition of *Escherichia coli* on the resistance to pulsed electric field (PEF) treatment. *LWT - Food Sci. Technol.* 76, 18e25.
- Mackey, B. M. (2000). “Injured bacteria,” in *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Vol. I, eds M. Lund, T. C. Baird-Parker, and G. W. Gould (Gaithersburg: Aspen Publisher), 315–341.
- Mahnic-Kalamiza, S., Vorobiev, E., 2014. Dual-porosity model of liquid extraction by pressing from biological tissue modified by electroporation. *J. Food Eng.* 137 (8), 76e87.
- Mañas, P., and Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1387–1399. doi: 10.1111/j.13652672.2005.02561.x
- Mañas, P., Pagán, R., Sala, F. J., and Condón, S. (2001b). Low molecular weight milk whey components protect *Salmonella senftenberg* 775W against heat by mechanism involving divalent

cations. *J. Appl. Microbiol.* 91, 871–877. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01453.x

- Medeiros, B.G.D.S., Souza, M.P., Pinheiro, A.C., Bourbon, A.I., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., Carneiro-Da-Cunha, M.G., 2014. Physical characterisation of an Alginate/lysozyme nano-laminate coating and its evaluation on ‘coalho’ cheese shelf life. *Food & Bioprocess Technol.* 7 (4), 1088e1098.
- Monfort, S., Sagarzazu, N., Condon, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2012). Liquid whole egg ultrapasteurization by combination of PEF, heat, and additives. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2070e2080.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2007. Influence of treatment time and pulse frequency on Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Listeria monocytogenes populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 117 (2), 192e200.
- Munoz, A., Palgan, I., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Whyte, P., Lyng, J.G., 2012~. Combinations of selected non-thermal technologies and antimicrobials for microbial inactivation in a buffer system. *Food Res. Int.* 47 (1), 100e105.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., and Schaechter, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. Sunderland: Sinaver Associates Inc.
- Oey, I., Ivander, P., Avan, L., Hendrickx, M., 2008. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems. *Trends Food Sci. Technol.* 19 (6), 300e308.
- Oliveira, M.A.D., Souza, V.M.D., Bergamini, A.M.M., 2011. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control* 22 (8), 1400e1403.
- Ortega-Rivas, E., 2012. High-Voltage Pulsed Electric Fields. Springer US.
- Oteiza, J. M., Giannuzzi, L., and Zaritzky, N. (2010). Ultraviolet treatment of orange juice to inactivate *E. coli* O157:H7 as affected by native microflora. *Food Bioproc. Technol.* 3, 603–614. doi: 10.1007/s11947-009-0194-y
- Otero, L., Perez-Mateos, M., Rodríguez, A.C., Sanz, P.D., 2017. Electromagnetic freezing: effects of weak oscillating magnetic fields on crab sticks. *J. Food Eng.* 200, 87e94.
- P, M.V., A, S.L., N, B.O., H, A., R, L.L., E, V., O, M.B., A, G., 2008. Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with

high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 128 (2), 244e249.

- Pagan, R., Manas, P., 2006. *Fundamental Aspects of Microbial Membrane Electroporation*. Springer US.
- Pakhomova, O.N., Khorokhorina, V.A., Bowman, A.M., Rodaite-Riseviciene, R., Saulis, G., Xiao, S., Pakhomov, A.G., 2012. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Arch. Biochem. Biophys.* 527 (1), 55.
- Palgan, I., Munoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Lyng, J.G., 2012.
- Pankiewicz, U., Sujka, M., Kowalski, R., Mazurek, A., Włodarczyk-Stasiak, M., Jamroz, J., 2017. Effect of pulsed electric fields (PEF) on accumulation of selenium and zinc ions in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Food Chem.* 221, 1361.
- Pasha, I., Saeed, F., Sultan, M.T., Khan, M.R., Rohi, M., 2014. Recent developments in minimal processing: a tool to retain nutritional quality of food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54 (3), 340e351.
- Patel, P., Markx, G.H., 2008. Dielectric measurement of cell death. *Enzyme & Microb. Technol.* 43 (7), 463e470.
- Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1400–1409. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x
- Peleg, M., 1995. A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *J. Sci. Food Agric.* 67 (7), 93e99.
- Pen˜a, M.D.L., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., 2011. Food preservation by pulsed electric fields: an engineering perspective. *Food Eng. Rev.* 3 (2), 94e107.
- Pereira, E., Antonio, A.L., Rafalski, A., Barreira, J.C.M., Barros, L., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Electron-beam irradiation as an alternative to preserve nutritional, chemical and antioxidant properties of dried plants during extended storage periods. *LWT- Food Sci. Technol.* 386e395.
- Pereira, R. N., & Vicente, A. A. (2010). Environmental impact of novel thermal and nonthermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43, 1936e1943.
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., Rols, M.P., 2016. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci. Rep.* 6, 19778.
- Pinaperez, M.C., Rodrigo, D., Martínez Lopez, A., 2009. Sub-lethal damage in *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* cells after different

pulsed electric field treatments in infant formula milk. *Food Control* 20 (12), 1145e1150.

- Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Ferrari, G., 2016. Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field/temperature treatment. *Bioresour. Technol.* 203, 80e88.
- Proulx, J., Sullivan, G., Marostegan, L.F., Vanwees, S., Hsu, L.C., Moraru, C.I., 2017. Pulsed light and antimicrobial combination treatments for surface decontamination of cheese: favorable and antagonistic effects. *J. Dairy Sci.* 100 (3), 1664e1673.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., and Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 49–55. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035
- Ramos, S. (2016). *Establecimiento de Criterios de Proceso Para el Procesado de Alimentos por alta Presión*. Doctoral Thesis, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Rao, L., Xu, Z., Wang, Y., Zhao, F., Hu, X., Liao, X., 2015. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high pressure CO₂ with high temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 73e80.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., and Sala, F. J. (2000). Predicting inactivation of
- Raso, J., Calderón, M. L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G. V., and Swanson, B. G. (1998a). Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31, 668–672. doi: 10.1006/fstl.1998.0426
- Raso, J., Calderón, M. L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G. V., and Swanson, B. G. (1998b). Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. *J. Food Sci.* 63, 1042–1044. doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15850.x
- Raso, J., Condón, J., and Sala-Trepat F. J. (1994). *Mano-Thermo-Sonication: a New Method of Food Preservation? Food Preservation by Combined Processes*. Final Report FLAIR Concerted Action No. 7, eds B. Subgroup, L. Lesitner, and L. G. M. Gorris. *Food Linked Agro-Industrial Research*. Directorate-General XII, Science, Research and Development.
- Raso, J., Góngora-Nieto, M., Barbosa-Cánovas, G., and Swanson, B. G. (1998c). Influence of several environmental factors on the initiation

- of germination on *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 125–132. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00130-5
- Ravishankar, S., Zhang, H., Kempkes, M.L., 2008. Pulsed electric fields. *Food Sci. Technol. Int.* 14 (5), 360e427.
 - Rodríguez, A.C., James, C., James, S.J., 2017. Effects of weak oscillating magnetic fields on the freezing of pork loin. *Food & Bioprocess Technol.* 1e7.
 - Rodríguez-Calleja, J. M., Cebrián, G., Condón, S., and Mañas, P. (2006). Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1054–1062.
 - Rosello-Soto, E., Barba, F. J., Parniakov, O., Galanakis, C. M., Lebovka, N., Grimi, N., *et al.* (2015). High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 885e894.
 - Sagarzazu, N., Cebrián, G., Pagán, R., Condón, S., and Mañas, P. (2010b). Resistance of *Campylobacter jejuni* to heat and to pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 314–321. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00778
 - Sagarzazu, N., Cebrian, G., Pagan, R., Condon, S., Man~as, P., 2010. Resistance of *Campylobacter jejuni* to heat and to pulsed electric fields. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2), 283e289.
 - Saidatul, S.W.K.W., Noriham, A., Zainal, S., Khairusy, S.Z., Nurain, A., 2013. Impact of non-thermal processing on antioxidant activity, phenolic content, ascorbic acid content and color of winter melon puree. *Int. Food Res. J.* 633e638.
 - Saldan~a, G., Monfort, S., Condon, S., Raso, J., Alvarez, I., 2012. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Res. Int.* 45 (2), 1080e1086.
 - Saldan~a, G., Puertolas, E., Con don, S., Alvarez, I., Raso, J., 2010. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2), 290e298.
 - Saldan~a, G., Puertolas, E., Lopez, N., García, D., Alvarez, I., Raso, J., 2009. Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in

media of pH 4 and 7. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 10 (2), 160e165.

- Saldana, G., Puertolas, E., Lopez, N., García, D., Alvarez, I., Raso, J., 2009. Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 10 (2), 160e165.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., and Raso, J. (2010c). Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J. Food Eng.* 2, 349–356.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010a). Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Food Microbiol.* 27, 550–558. doi: 10.1016/j.fm.2010.01.002
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010b). Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 290–298. doi: 10.1016/j.ifset.2010.01.003
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010c). Inactivation kinetics of pulsed electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Food Microbiol.* 27, 550–558. doi: 10.1016/j.fm.2010.01.002
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010b). Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 290–298. doi: 10.1016/j.ifset.2010.01.003
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010c). Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J. Food Eng.* 2, 349–356.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010b). Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 290–298. doi: 10.1016/j.ifset.2010.01.003
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010c). Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J. Food Eng.* 2, 349–356.
- Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M., 2007. Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk based beverage: effect of process parameters. *J. Food Eng.* 80 (3), 931e938.
- Sen, Y., Mutlu, M., 2013. Sterilization of food contacting surfaces via non-thermal plasma treatment: a model study with *Escherichia coli* - contaminated stainless steel and polyethylene surfaces. *Food & Bioprocess Technol.* 6 (12), 3295e3304.
- Setlow, P. (2001). Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ. Molec. Mutagenesis* 38, 97–104. doi: 10.1002/em.1058
- Sharma, P., Oey, I., Bremer, P., Everett, D.W., 2014. Reduction of bacterial counts and inactivation of enzymes in bovine whole milk using pulsed electric fields. *Int. Dairy J.* 39 (1), 146e156.
- Sobrino-Lopez, A., Viedma-Martínez, P., Abriouel, H., Valdivia, E., Galvez, A., Martín-Belloso, O., 2009. The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with *Staphylococcus aureus* and processed by high-intensity pulsed-electric field. *J. Dairy Sci.* 92 (6), 2514e2523.

- Soliman, N.S.M., Aly, S.A., 2011. Occurrence and identification of yeast species isolated from Egyptian Karish cheese. *J. Yeast Fungal Res.* (4), 59e64.
- Somolinos, M., García, D., Man~as, P., Condon, S., Pagan, R., 2008a. Effect of environmental factors and cell physiological state on Pulsed Electric Fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 124 (3), 260e267.
- Somolinos, M., García, D., Man~as, P., Condon, S., Pagan, R., 2010. Organic acids make *Escherichia coli* more resistant to pulsed electric fields at acid pH. *Int. J. Food Microbiol.* 136 (3), 381e384.
- Somolinos, M., Manas, P., Con~ don, S., Pagan, R., García, D., 2008b. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* sublethally injured cells after pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 125 (3), 352e356.
- Stoica, M., Bahrim, G., & Ca^ra^c, G. (2011). Factors that influence the electric field effects on fungal cells. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 291e302.
- Stoica, M., Mihalcea, L., Borda, D., & Alexe, P. (2013). Nonthermal novel food processing technologies. An overview. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19, 212e217.
- Stratford, M., Nebe-Von-Caron, G., Steels, H., Novodvorska, M., Ueckert, J., Archer, D.B., 2013. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 161 (3), 164e168.
- Taiwo, K. A., Angersbach, A., & Knorr, D. (2002). Influence of high intensity electric field pulses and osmotic dehydration on the rehydration characteristics of apple slices at different temperatures.
- Tanino, T., Sato, S., Oshige, M., Ohshima, T., 2012. Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *J. Electrostat.* 70 (2), 212e216.
- Tedjo, W., Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (2002). Einsatz, nicht-thermischer verfahren zur zell-permeabilisierung von weintrauben ung gewinnung von inhaltsstoffen. *Fluessiges Obst*, 9, 578e583.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 137e145.

- Toepfl, S., Heinz, V., Knorr, D., 2007. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 46 (6), 537e546.
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2006). Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Reviews International*, 22, 405e423.
- Toepfl, S., Siemer, C., Heinz, V., 2014a. Effect of high-intensity electric field Pulses on Solid foods. In: *Emerging Technologies for Food Processing*, pp. 147e154.
- Toepfl, S., Siemer, C., Saldan~a-Navarro, G., Heinz, V., 2014b. Overview of pulsed electric fields processing for food. *Emerg. Technol. Food Process.* 93e114.
- Tsong, T.Y., 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* 60 (2), 297e306.
- Ulmer, H.M., Heinz, V., Ga€nzle, M.G., Knorr, D., Vogel, R.F., 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *J. Appl. Microbiol.* 93 (2), 326e335.
- Van Doren, J.M., Neil, K.P., Parish, M., Gieraltowski, L., Gould, L.H., Gombas, K.L., 2013. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 19732010. *Food Microbiol.* 36 (2), 456e464.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Riener, J., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2008). Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89, 267e273.
- Wang, L.H., Wang, M.S., Zeng, X.A., Gong, D.M., Huang, Y.B., 2016a. An in vitro investigation of the inhibitory mechanism of β -galactosidase by cinnamaldehyde alone and in combination with carvacrol and thymol. *Biochim. Biophys. Acta* 1861 (1), 3189e3198.
- Wang, Y., Wang, Z., Handa, C.L., Xu, J., 2017. Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of β -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food Chem.* 218, 165e172.
- Wouters, P.C., Alvarez, I., Raso, J., 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 12 (3e4), 112e121.
- Wu, V.C., 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol.* 25 (6), 735e744.

- Wu, V.C., 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol.* 25 (6), 735e744.
- Yamamoto, K., 2017. Food processing by high hydrostatic pressure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81 (4), 672e679.
- Yeom, H. W., Streaker, C. B., & Zhang, Q. H. (2000). Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice. *Journal of Food Science*, 65(8), 1359e1363.
- Yun, O., Liu, Z.W., Zeng, X.A., Han, Z., 2016. Salmonella typhimurium resistance on pulsed electric fields associated with membrane fluidity and gene regulation. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 36, 252e259.
- Zhang, F., Tian, M., Du, M., Fang, T., 2017. Enhancing the activity of pectinase using pulsed electric field (PEF) treatment. *J. Food Eng.* 205, 56e63.
- Zhang, H. Q., Barbosa-Canovas, G., Dunne, P., Farkas, D., & Yuan, J. (2011). *Nonthermal processing technologies for food*. John Wiley & Sons.
- Zhao, F., Zhou, L., Wang, Y., Liao, X., 2016. Role of peach proteins in juice precipitation induced by high pressure CO₂. *Food Chem.* 209, 81e89.
- Zhao, W., Yang, R., Shen, X., Zhang, S., Chen, X., 2013. Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control* 32 (1), 6e12.
- Zhao, W., Yang, R., Wang, M., 2009. Cold storage temperature following pulsed electric fields treatment to inactivate sublethally injured microorganisms and extend the shelf life of green tea infusions. *Int. J. Food Microbiol.* 129 (2), 204e208.
- Zhao, W., Yang, R., Zhang, H.Q., Zhang, W., Hua, X., Tang, Y., 2011. Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on *Escherichia coli* cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques. *Food Control* 22 (3), 566e573.
- Zhou, Y.J., Xue, C.M., Zhang, S.S., Yao, G.M., Zhang, L., Wang, S.J., 2017. Effects of high intensity pulsed electric fields on yield and chemical composition of rose essential oil. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 10 (3), 295e301.

Ringraziamenti

Dopo tre lunghi anni, finalmente questo giorno è arrivato; scrivere queste brevi frasi di ringraziamento è il tocco finale della mia tesi.

È stato un percorso lungo e tortuoso, ma pieno di emozioni, sia dal punto di vista dell'apprendimento, che dal punto di vista personale. Vorrei quindi spendere due parole per ringraziare tutte le persone che mi hanno sostenuto e aiutato durante questo periodo.

Prima di tutto voglio ringraziare il mio relatore, il professore A. Gianotti, il quale mi ha aiutata fin dall'inizio della stesura, seguendomi passo passo e dandomi i giusti consigli per poter portare a termine il lavoro di tesi nel migliore dei modi. Per questo motivo mi sento di ringraziarlo dal profondo del mio cuore, perchè è anche grazie a lui se sono qui oggi.

A questo punto, un ringraziamento molto sentito va alla mia famiglia: i miei genitori, mio fratello, i miei zii, le mie cugine e il nonno. Senza di loro, probabilmente il mio percorso universitario non sarebbe mai cominciato, mi hanno sempre sostenuto, sono sempre stati al mio fianco nonostante tutto, un grazie non basterà mai, spero tanto di avervi regalato una piccola soddisfazione per ricambiare il vostro sostegno e il vostro amore. Saranno sempre i miei punti di riferimento nella vita.

È arrivato il momento di ringraziare la mia ancora di salvezza, Giada Piraccini, una compagna di corso, la quale si è poi trasformata in una delle mie più care amiche, posso tranquillamente dire che senza di lei il mio percorso universitario non sarebbe stato lo stesso, è stata fondamentale, non solo per il corso di studi, ma anche per quanto riguarda la vita di tutti i giorni. Ovviamente ringrazio anche le amiche e gli amici di sempre, con i quali sono cresciuta e con i quali mi sono sfogata durante questo percorso fatto di alti e bassi.

Un ringraziamento va anche al mio ragazzo, per essermi stato vicino in questi tre anni, e per fare parte della mia vita.

Mi sento molto fortunata ad avere vicino persone come voi, quindi grazie dal più profondo del mio cuore.

Noemi Mottola.