



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN POR ULTRA ALTA  
PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN DE  
MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS LÍQUIDOS.  
VALORACIÓN DE LOS PROCESOS DE LIMPIEZA Y  
DESINFECCIÓN DEL EQUIPO

**TESIS DOCTORAL**

**MEMORIA PRESENTADA PARA  
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**WILFIDO JOSÉ BRIÑEZ ZAMBRANO  
Bellaterra 2006**



## **C. E. R. PLANTA DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS**



Membre de:



**FACULTAD DE VETERINARIA  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS**

**ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN POR ULTRA ALTA  
PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN DE  
MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS LÍQUIDOS.  
VALORACIÓN DE LOS PROCESOS DE LIMPIEZA Y  
DESINFECCIÓN DEL EQUIPO**

**MEMORIA PRESENTADA COMO COMPENDIO  
DE PUBLICACIONES PARA OPTAR AL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**WILFIDO JOSÉ BRIÑEZ ZAMBRANO  
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) 2006**

BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, Catedrático de Tecnología de los Alimentos y  
ARTUR XAVIER ROIG SAGUÉS, Profesor Titular de Nutrición y Bromatología,  
adsritos al Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Universidad  
Autónoma de Barcelona,

HACEN CONSTAR: Que el Licenciado en Veterinaria Wilfido José Briñez Zambrano  
ha realizado, bajo nuestra dirección, en el “*Centre Especial de Recerca Planta de  
Tecnologia dels Aliments (CERPTA)*”, Departamento de Ciencia Animal y de los  
Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona, el trabajo titulado “Estudio de  
la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de microorganismos en  
alimentos líquidos. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección del equipo”  
que presenta para optar al grado de Doctor, y considerándolo acabado, autorizamos su  
presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del  
Vallès), el 07 de Febrero del 2006.

Buenaventura Guamis López

Artur Xavier Roig Sagués

## **DEDICATORIA**

A Dios Todopoderoso

A mi Madre Enifamia Josefina

A mi Padre Rafael Ángel

A mi Esposa Ana Graciela

A mis Hijas María José y María Valentina

A mis Hermanos Marberis, Rafael, Braulio y Kervys

A Dios todo poderoso que todo lo puede y lo guía. A mis padres Enifamia y Rafael que me dieron el ser y con su ejemplo, trabajo, tesón, sacrificio y cariño me sacaron adelante en aquellos tiempos difíciles para que yo fuera lo que ellos no pudieron ser. A mi esposa Ana Graciela por su amor, paciencia y apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida. A mis hijas María José y María Valentina por darme tantas alegrías y por esas muchas horas dedicadas a mi trabajo que he dejado de compartir con ellas. A mis hermanos por su apoyo incondicional y comprensión.

## AGRADECIMIENTOS

La realización de mis estudios de doctorado que culminan con la presentación de esta memoria implicó grandes sacrificios, perseverancia, superación de grandes obstáculos y adaptación a un nuevo estilo de vida en un país que me acogió con sus brazos abiertos lejos de mi patria. Con estas palabras quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una forma u otra me han ayudado en estos años de camino que culminan con la presentación de esta Tesis, y en especial:

En primer lugar a Artur Xavier Roig Sagués por todo el tiempo dedicado, orientación, confianza en mi, amistad, paciencia, apoyo y por compartir sus conocimientos como director de tesis.

A Buenaventura Guamis López por acogerme en el “*Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA)*”. Por su dirección, ideas, enseñanzas y visión practica del mundo científico.

A la profesora Maria Manuela Hernández Herrero por su apoyo, orientación, confianza, amistad y por saber escuchar en esos momentos de desánimo.

A la universidad del Zulia, de cuya familia formo parte por el cofinanciamiento y permiso otorgado para realizar los estudios de doctorado que me han permitido alcanzar mi crecimiento profesional, pero también el conocer otra cultura y su gente en este hermoso país “Catalunya”.

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de Venezuela (FONACIT), organismo adscrito al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por el cofinanciamiento

otorgado que me ha permitido la permanencia en este país con mi familia y llevar a feliz termino mis estudios de doctorado.

A todos mis compañeros de doctorado y faena, con los cuales he compartido grandes momentos en estos 4 años. En especial a Tomás López, Silvia De Lamo, Beatriz Valdés, Ibrahima Cisse, Víctor Gélvez, Diana Espinosa, Antonella Murasso, Dora Salas, Nuria Fuster, Manuel López, Luis Galán, Fabián González, Laura Grau, Diana Jaramillo, Agatangelo Eduardo, Imane Lachiri, Patricia Pozo, Maria del Mar Serra, Pilar Trespalacios, Bibiana Juan, Patricia Montealegre y Martina Claussner. A Joan Miquel Quevedo y Dolors Busquets por el apoyo y los momentos compartidos en la planta y en el laboratorio. A mis compañeros del CERPTA Ramón Gervilla, Martín Buffa, Antonio Trujillo, Victoria Ferragut, Juan José Rodríguez, Reyes Pla, Josep Yuste, Marta Capellas, Monserrat Mor-Mur y Sonia Llorens por los conocimientos y apoyo recibido durante estos años.

A mis colegas y compañeros Venezolanos, que estuvieron aquí y compartieron conmigo y mi familia durante estos 4 años, haciendo mucho mas grata mi estancia en España, Atilio, además de compadre un gran amigo; Xomaira, Willian, Denice, Aixa, José Antonio, Armando, Westalia, Fanny, Antonio, Gabriela, Gustavo, José, Carolina, Francisco y Rita, gracias por su compañía y amistad.

A mi amigo Jorge Luis Ruiz Ramírez y su familia, compañero de trabajo y de estudios desde mi carrera de Licenciatura hasta los estudios doctorales en la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), de la cual seremos sus egresados, por su solidaridad y apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A la extraordinaria comunidad Autónoma de Catalunya, donde he visto nacer a mi segunda hija María Valentina y a la cual quiero como mi segunda patria.

A todas las personas que de alguna forma u otra intervinieron en este trabajo y escaparon de mi memoria en este momento.

**¡A todos mi más profundo agradecimiento!**





## ÍNDICE DE CONTENIDO

Constancia .....	V
Dedicatoria .....	VII
Agradecimientos .....	IX
Índice de Contenidos .....	XIII
Lista de Tablas no incluidas en las publicaciones .....	XXIII
Lista de Figuras no incluidas en las publicaciones .....	XXV
Lista de Abreviaturas .....	XXVII
Prefacio .....	XXXI
Resumen .....	XXXIII
Abstract .....	XXXVII
Resum .....	XLI
<b>Capítulo I: Introducción y Objetivos</b> .....	<b>1</b>
1. Introducción .....	3
2. Objetivos .....	9
2.1. Objetivo general .....	9
2.2. Objetivos específicos .....	9
3. Referencias bibliográficas .....	11
<b>Capítulo II: Revisión bibliográfica</b> .....	<b>19</b>
1. Procesos de limpieza y desinfección .....	21
1.1. Objetivos de los procesos de limpieza y desinfección .....	21
2. Programas de limpieza y desinfección en la industria alimentaria .....	22
	XIII

2.1. Importancia de la implementación de un programa de limpieza y desinfección .....	22
2.2. Factores a considerar en la implementación de un programa de limpieza y desinfección .....	23
2.3. Etapas del programa de limpieza y desinfección .....	25
3. Productos desinfectantes .....	27
3.1. Definición .....	27
3.2. Tipos y mecanismos de acción .....	27
3.3. Compuestos peroxigénicos .....	29
3.4. Factores que afectan la eficacia de los productos desinfectantes	32
3.4.1. Condiciones de crecimiento y tipo de microorganismo .....	33
3.4.2. Sustancias interferentes .....	33
3.4.3. El pH .....	34
3.4.4. Temperatura .....	34
3.4.5. Tiempo de contacto .....	35
3.4.6. Concentración .....	36
3.5. Valoración de la eficacia de los desinfectantes en pruebas de suspensión .....	36
3.6. Condiciones para la comprobación de la eficacia del desinfectante .....	38
3.7. Valoración de la eficacia de los desinfectantes en superficies ..	42
4. Tratamientos de conservación de alimentos fluidos .....	44
4.1. Tratamientos térmicos .....	44
4.2. Tratamientos no térmicos .....	46

4.2.1. Irradiación de alimentos .....	47
4.2.2. Campos eléctricos pulsantes .....	48
4.2.3. Pulsos luminosos .....	49
4.2.4. Altas presiones hidrostáticas .....	50
5. Ultra alta presión de homogeneización .....	54
5.1. Tipos de homogeneizadores de alta presión .....	56
5.2. Aplicaciones en el procesado de los alimentos .....	60
5.3. Efecto sobre la preparación de emulsiones .....	61
5.4. Efecto sobre las propiedades y componentes de la leche .....	62
5.5. Efecto sobre las enzimas de los alimentos .....	65
5.5.1. Efecto sobre la fosfatasa alcalina .....	65
5.5.2. Efecto sobre la lactoperoxidasa .....	67
5.5.3. Efecto sobre la lipasa .....	68
5.5.4. Efecto sobre la plasmina .....	69
5.5.5. Efecto sobre la pectin metilesterasa .....	70
5.6. Efecto sobre los microorganismos .....	71
5.6.1. Mecanismos de inactivación de la UHPH sobre los microorganismos .....	71
5.6.2. Factores que afectan la inactivación de microorganismos tratados por UHPH .....	72
5.6.2.1. Tipo de microorganismo .....	72
5.6.2.2. Temperatura de entrada de la muestra .....	74
5.6.2.3. Tipo de matriz .....	75

5.6.2.4. Nivel de presión .....	76
5.6.2.5. Número de pases de tratamientos .....	77
5.6.3. Daños subletales causados en microorganismos tratados por UHPH .....	78
6. Referencias bibliográficas .....	80
<b>Capítulo III: Materiales y Métodos</b>	<b>95</b>
1. Procedimiento general .....	97
2. Valoración de la eficacia del desinfectante .....	99
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	99
2.2. Preparación de las suspensiones bacterianas de ensayo .....	100
2.3. Preparación de la solución desinfectante .....	100
2.4. Preparación de las sustancias interferentes .....	101
2.5. Experimentos para determinar la actividad bactericida .....	101
2.6. Efectividad del desinfectante .....	102
2.7. Tratamiento estadístico de los datos en las pruebas de suspensión .....	102
2.8. Condiciones de limpieza y desinfección ensayadas en la máquina de UHPH .....	102
2.9. Procedimiento de limpieza y desinfección aplicado a la máquina de UHPH .....	104
3. Evaluación de la inactivación de microorganismos usando tratamientos de UHPH .....	105
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	105
3.2. Preparación de la suspensión de células e inoculación de leche	

y zumo de naranja .....	105
3.3. Tratamiento por UHPH de muestras inoculadas de leche y zumo de naranja .....	106
3.4. Análisis microbiológico .....	107
3.5. Tratamiento estadístico de los datos .....	109
4. Referencias bibliográficas .....	113
<b>Capítulo IV: Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Listeria</i> spp. and <i>Escherichia coli</i></b>	<b>115</b>
Abstract .....	117
1. Introduction .....	117
2. Materials and methods .....	118
2.1. Bacterial strains and growth conditions .....	118
2.2. Bacterial suspension preparation .....	118
2.3. Disinfectant solution and preparation .....	118
2.4. Interfering substances .....	119
2.5. Killing Experiments .....	119
2.6. Statical treatment of data .....	119
3. Results and discussion .....	119
4. Acknowledgements .....	121
5. References .....	122
<b>Capítulo V: Inactivation of <i>Listeria innocua</i> in milk and orange by using ultrahigh-pressure homogenisation</b>	<b>123</b>
Abstract .....	125

1. Introduction .....	125
2. Materials and methods .....	126
2.1. Bacterial strains used and growth conditions .....	126
2.2. Preparation of cell suspension and inoculation of whole milk and orange juice .....	126
2.3. High-pressure treatment of whole milk and orange juice .....	126
2.4. Cleaning and disinfection of high-pressure machine .....	126
2.5. Microbiological analysis .....	127
2.6. Statistical treatment of data .....	127
3. Results .....	127
4. Discussion .....	127
5. Conclusions .....	129
6. Acknowledgements .....	130
7. References .....	130
<b>Capítulo VI: Inactivation of two strains of <i>Escherichia coli</i> inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation</b> .....	<b>133</b>
Abstract .....	135
Résumé .....	136
1. Introduction .....	137
2. Materials and methods .....	139
2.1. Bacterial strains used and growth conditions .....	139
2.2. Preparation of cell suspension and inoculation of whole and skim milk .....	139

2.3. Ultrahigh-pressure homogenization treatment of the milk .....	140
2.4. Microbiological analysis .....	141
2.5. Statistical treatment of data .....	141
3. Results and discussion .....	142
4. Conclusions .....	149
5. Acknowledgements .....	149
6. References .....	149
<b>Capítulo VII: Inactivation by Ultrahigh-pressure homogenisation of <i>Escherichia coli</i> strains inoculated in orange juice</b>	<b>155</b>
Abstract .....	157
1. Introduction .....	158
2. Materials and methods .....	160
2.1. Bacterial strains and growth conditions .....	160
2.2. Preparation of cell suspension and inoculation into orange juice .....	160
2.3. High-pressure treatment of orange juice .....	161
2.4. Microbiological analysis .....	162
2.5. Statistical analysis .....	163
3. Results .....	163
4. Discussion .....	165
5. Conclusions .....	171
6. Acknowledgements .....	171
7. References .....	171

<b>Capítulo VIII: Inactivation of <i>Staphylococcus</i> spp. strains in whole milk and orange juice using ultrahigh-pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20 °C</b>	<b>177</b>
Abstract .....	179
1. Introduction .....	180
2. Materials and methods .....	182
2.1. Bacterial strains used and growth conditions .....	182
2.2. Preparation of cell suspension and inoculation of whole milk and orange juice .....	182
2.3. High pressure treatment of inoculated samples .....	183
2.4. Microbiological analysis .....	184
2.5. Statistical treatment of data .....	185
3. Results and discussion .....	185
4. Conclusions .....	193
5. Acknowledgments .....	194
6. References .....	194
<b>Capítulo IX: Discusión global de los resultados</b>	<b>199</b>
1. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección del equipo de UHPH .....	201
1.1. Eficacia bactericida del PAHP contra cepas de los géneros <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> y <i>Escherichia</i> en pruebas de suspensión ..	201
1.2. Eficacia bactericida del PAHP contra cepas de los géneros <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> y <i>Escherichia</i> en la máquina de UHPH ...	204
2. Evaluación de la inactivación causada por la UHPH en cepas bacterianas inoculadas en leche y zumo de naranja .....	208



2.1. Inactivación de <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. carnosus</i> y <i>S. aureus</i> en leche y zumo de naranja .....	208
2.1.1. Efectos del tipo de microorganismo en la inactivación de cepas bacterianas tratadas por UHPH .....	209
2.1.2. Efecto de la temperatura de entrada y tipo de matriz en la inactivación de cepas bacterianas tratadas por UHPH .....	214
2.1.3. Daños subletales en cepas bacterianas tratadas por UHPH .	217
2.1.4. Evolución de los recuentos de cepas bacterianas tratadas por UHPH y almacenadas a 4 °C .....	218
3. Referencias bibliográficas .....	221
<b>Capítulo X: Conclusiones</b>	<b>227</b>
1. Conclusiones .....	229



## LISTA DE TABLAS NO INCLUIDAS EN LAS PUBLICACIONES

Tabla 1.	Tratamientos térmicos más utilizados por la industria para la conservación de leche, zumos y otros alimentos fluidos perecederos .....	45
Tabla 2.	Ventajas y desventajas de la alta presión hidrostática .....	53
Tabla 3.	Esquema general de los experimentos realizados .....	98
Tabla 4.	Condiciones generales ensayadas en el proceso de limpieza y desinfección del equipo UHPH .....	104
Tabla 5.	Efecto de la concentración de PAHP, tiempo de exposición, temperatura del agua y concentración de jabón en la eliminación de la microbiota en un equipo de UHPH .....	206



## LISTA DE FIGURAS NO INCLUIDAS EN LAS PUBLICACIONES

Figura 1.	Esquema de una válvula en un sistema de homogeneización convencional .....	55
Figura 2.	Sección transversal de la válvula de un homogeneizador <i>APV-Gaulin</i> . Flujo de la materia presurizada, cabezal y asiento de la válvula .....	58
Figura 3.	Sección transversal de la válvula de un homogeneizador <i>Stansted model/DRG FPG7400H:350</i> . Flujo de la materia presurizada, cabezal y asiento de la válvula .....	59
Figura 4.	Parte externa del homogeneizador de ultra alta presión <i>Stansted model/DRG FPG7400H:350</i> .....	110
Figura 5.	Parte interna del homogeneizador de ultra alta presión <i>Stansted model/DRG FPG7400H:350</i> .....	111
Figura 6.	Plan de trabajo general de los ensayos de UHPH .....	112
Figura 7.	Inactivación de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090, <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 CCUG 44857, <i>Staphylococcus carnosus</i> CECT 4491 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565 en leche entera tratadas por UHPH (300 + 30 MPa) usando temperaturas de entrada de 6 y 20 °C .....	211
Figura 8.	Inactivación de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090, <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 CCUG 44857, <i>Staphylococcus carnosus</i> CECT 4491 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565 en zumo de naranja	

tratado por UHPH (300 + 30 MPa) usando temperaturas de entrada de 6 y 20 °C ..... 212

Figura 9. Inactivación de *Escherichia coli* ATCC 10536 y *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 en leche desnatada tratada por UHPH (300 + 30 MPa) usando temperaturas de entrada de 6 y 20 °C ..... 213

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a</i>	Componente roja en la variable color ( <i>L, a, b</i> )
AENOR	Asociación Española de Normalización y Certificación
AFNOR	<i>Association Française de Normalization</i> (Asociación Francesa de Normalización)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemistry</i> (Asociación Oficial de Química Analítica)
APV	<i>Aluminium Plant &amp; Vessel company</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATP	Adenosin trifosfato
<i>b</i>	Componente amarilla en la variable color ( <i>L, a, b</i> )
CCUG	<i>Culture Collection, University of Göteborg</i> (Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CEN	Comité Europeo de Normalización
CERPTA	<i>Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments</i>
CFU	<i>Colonies Form Units</i> (Unidades Formadoras de colonias)
CRAFT	<i>Coperative Research Projets</i> (Proyectos Cooperativos de investigación)
CST	Cloruro de Sodio Triptona
DGHM	<i>Deutsche Gesellschaft Hygiene Mikrobiologie</i> (Compañía Alemana de Higiene y Microbiología)
DR	<i>Decimal Reduction</i> (Reducción Decimal)
DSMZ	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i> (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Ec157	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

EN	Norma Europea
et al.	Y colaboradores
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica)
FONACIT	Fondo Nacional Para la Ciencia y la Tecnología de Venezuela
g	Gramos masa
GLM	<i>General Linear Model</i> (Modelo Lineal Generalizado del paquete estadístico SAS)
h	Horas
HHP	<i>High Hydrostatic Pressure</i> (Alta Presión Hidrostática)
HTST	<i>High Temperature Short Time</i> (Altas Temperaturas en periodos Cortos de Tiempo)
KGy	KiloGrays
Kv	Kilovoltios
l	Litros
<i>L</i>	Luminosidad o claridad en la variable color ( <i>L, a, b</i> )
Li	<i>Listeria innocua</i>
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
Log	Logaritmo
LTLT	<i>Low Temperature Long Time</i> (Bajas Temperaturas en periodos Prolongados de Tiempo)
LSmeas	<i>Least Squares Means</i> (Medias por Cuadrados Mínimos)
mg	Miligramos
mL	Mililitro
MPa	Megapáscales (1 MPa = 10 Bares)
N	Logaritmo del recuento de colonias en muestras controles o no



	tratadas por ultra alta presión de homogeneización
$N_f$	Número de UFC/mL en placas de Agar Triptona Soja después del tiempo de exposición al desinfectante
$N_i$	Número de UFC/mL en placas de Agar Triptona Soja en la suspensión inicial de células empleada para las pruebas de desinfectantes diluidas dos veces
nm	Nanómetros
$N_o$	Logaritmo del recuento de colonias en muestras tratadas por ultra alta presión de homogeneización
$P$	Probabilidad
PAHP	Mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Buffer Fosfato Salino)
PNT	Protocolos Normalizados de Trabajo
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAS	<i>Statistical Analysis Systems</i> (Sistema de Análisis Estadístico)
Sc	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TSA	Agar Triptona Soja
TSAYE	Agar Triptona Soja + 6 g/L de extracto de levadura
TSAYE + NaCl	Agar Triptona Soja + 6 g/L de extracto de levadura + 20, 30 ó 60 g/L NaCl
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UHPH	<i>Ultra High Pressure Homogenization</i> (Ultra Alta Presión de Homogeneización)
UHT	<i>Ultra High Temperatura</i> (Ultra Alta Temperatura)
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica)
UV	Luz ultra violeta



## PREFACIO

Esta memoria es el resultado de cuatro años de investigar el efecto de la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) sobre cepas bacterianas de los géneros *Staphylococcus*, *Listeria* y *Escherichia* inoculadas en matrices como leche y zumo de naranja presurizadas a temperaturas de 6 y 20 °C. Además, se ha investigado la eficacia bactericida de una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno contra cepas de estos mismos géneros en presencia de diferentes tipos de materia orgánica, con el fin de desarrollar un procedimiento de limpieza y desinfección eficiente adaptado a la máquina de UHPH. Esta investigación se desarrolló en el *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments* (CERPTA).

Su contenido está dividido en diez capítulos, correspondiendo el capítulo uno a la introducción y a los objetivos de la Tesis Doctoral. Este capítulo comprende: el planteamiento y una revisión general del problema que se estudia en la presente investigación, y los objetivos que se pretenden alcanzar.

El segundo capítulo corresponde a la revisión bibliográfica donde se describen los procesos de limpieza y desinfección, los productos desinfectantes, métodos de valoración de la eficacia de los productos desinfectantes, tratamientos de conservación de alimentos y las UHPH con los diferentes factores que la afectan, y sus efectos sobre los diferentes componentes de los alimentos y los microorganismos.

El tercer capítulo corresponde a los materiales y a la metodología empleados en la investigación, la cual se encuentra estructurada en cinco experimentos. El experimento uno fue preliminar y sirvió para seleccionar y evaluar el desinfectante para ser utilizado en la desinfección del homogeneizador de UHPH, así como, para establecer un procedimiento de limpieza y desinfección del homogeneizador después de haber sido usado para presurizar matrices inoculadas con diferentes cepas bacterianas. Los experimentos del dos al cinco se realizaron con la intención de evaluar la capacidad de la UHPH para reducir la carga bacteriana de microorganismos inoculados en diferentes matrices presurizadas a UHPH con bajas temperaturas de entrada en el homogeneizador. En todos los experimentos de UHPH se evaluó el

efecto de la temperatura de entrada en el grado de inactivación de los microorganismos, así como, la capacidad de estos para sobrevivir a lo largo del tiempo a temperaturas de refrigeración después de los tratamientos de presurización. Además, se evaluó la capacidad de la UHPH de causar daños subletales en las diferentes cepas bacterianas empleando medios de cultivo enriquecidos y estresantes.

En los capítulos del cuatro al ocho se presentan las publicaciones generadas producto de esta investigación, correspondiendo el capítulo cuatro a la eficacia bactericida del ácido peracético en combinación con el peróxido de hidrógeno contra cepas patógenas y no patógenas de *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. y *Escherichia coli*; el capítulo cinco al estudio de la inactivación de *Listeria innocua* en leche y zumo de naranja usando ultra alta presión de homogeneización; el capítulo seis la inactivación de dos cepas de *Escherichia coli* inoculadas en leche entera y desnatada por ultra alta presión de homogeneización; el capítulo siete a la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de cepas de *Escherichia coli* inoculadas en zumo de naranja, y el capítulo ocho a la inactivación de cepas de *Staphylococcus* spp. en leche entera y zumo de naranja usando ultra alta presión de homogeneización a temperaturas de entrada de 6 y 20 °C.

El capítulo nueve comprende la discusión global de los resultados, donde se discuten de forma conjunta los resultados obtenidos en cada experimento y el capítulo diez corresponde a las conclusiones alcanzadas en esta investigación.

También hay un apartado que corresponde a los anexos donde se incluyen las comunicaciones presentadas en congresos. Con esta estructuración de la presente Tesis Doctoral se pretende una mejor comprensión de la misma para todos los lectores.

Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Febrero de 2006

## RESUMEN

### **Estudio de la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de microorganismos en alimentos líquidos. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección del equipo (Tesis doctoral).**

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue evaluar la inactivación bacteriana usando Ultra Alta Presión de Homogeneización (UHPH) a 300 + 30 MPa de las cepas *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 y *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculadas en leche entera, leche desnatada y zumo de naranja. También, intentamos estudiar el efecto de la temperatura de entrada de la leche y del zumo en la máquina de alta presión sobre la letalidad y producción de daños subletales en estos microorganismos, así como la habilidad de estos para sobrevivir, recuperarse y crecer en condiciones de refrigeración después del tratamiento de UHPH. Dado que no existían protocolos previos de limpieza y desinfección de la máquina de UHPH que garantizara la correcta desinfección entre un ensayo y otro, el experimento 1 tuvo como objetivo evaluar la eficacia bactericida como reducción decimal (DR) de una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno (PAHP) contra cepas de *Staphylococcus*, *Listeria* y *Escherichia coli* en presencia de diferentes tipos de materia orgánica, tiempos de exposición y concentración de desinfectante. También comparamos la resistencia de cepas patógenas y no patógenas de estos géneros en busca de microorganismos alternativos para usar en la valoración de desinfectantes en el desarrollo de un procedimiento de limpieza y desinfección eficiente adaptado a la máquina de UHPH. Una vez ajustado y evaluado, el proceso de desinfección, el experimento 2 tuvo como finalidad evaluar la eficacia bactericida de los tratamientos de UHPH contra *Listeria innocua* ATCC 33090 inoculada en leche entera UHT y zumo de naranja UHT, así como estudiar el efecto de la temperatura de entrada en la máquina sobre la letalidad y la producción de daños subletales en este

microorganismo. Así mismo se estudió su habilidad de sobrevivir, repararse y crecer almacenado en refrigeración después del tratamiento de UHPH. Los experimentos 3 y 4 tuvieron como objetivo evaluar la inactivación por UHPH de *Escherichia coli* ATCC 10536 y *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 inoculadas en leche entera UHT, leche desnatada UHT y zumo de naranja UHT, considerando el efecto de la temperatura de entrada de la leche y el zumo, en los valores de letalidad y la capacidad del tratamiento de producir daños subletales en estas cepas. También estudiamos la habilidad de estos microorganismos de sobrevivir, repararse y crecer durante su conservación a 4,0 °C tras el tratamiento de UHPH. El experimento 5 tuvo como propósito evaluar la inactivación inducida por UHPH en *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 y *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculados en leche entera UHT y zumo de naranja UHT, considerando el efecto de la temperatura de entrada de la muestra en los valores de letalidad, así como la producción de daños subletales en estas cepas, y su capacidad de sobrevivir, repararse y crecer almacenados a bajas temperaturas tras el tratamiento de UHPH. Con respecto a la evaluación del desinfectante, *Staphylococcus* spp. mostró mayor resistencia a bajas concentraciones de desinfectante que las cepas de *Escherichia coli* y *Listeria* spp. El huevo fue la materia orgánica con mayor capacidad interferente mientras que el zumo de naranja presentó la menor capacidad interferente. Sin embargo, el PAHP fue efectivo (reducciones > 5 log UFC/mL) a concentraciones superiores a 0,1 % y 10 minutos de exposición, en todos los casos. No fueron encontradas diferencias estadísticas entre cepas patógenas y no patógenas del mismo grupo. En cuanto a los tratamientos de inactivación por UHPH, en *Listeria innocua* ATCC 33090, tanto la temperatura de entrada como el tipo de matriz influenciaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) su inactivación, que fue mayor a una temperatura de entrada de 20 °C. Los tratamientos por UHPH no causaron daños subletales en *Listeria innocua*. Durante el almacenamiento a 4 °C después de los tratamientos, los recuentos de *Listeria innocua* en leche aumentaron alrededor de 2 unidades logarítmicas entre los días 0 y 9, mientras que en zumo de naranja disminuyeron 2,5 unidades logarítmicas entre los

días 0 y 18. El nivel de inactivación fue similar para ambas cepas de *Escherichia coli* en leche y no fueron detectados daños subletales después de los tratamientos tanto en leche como en zumo de naranja. La temperatura de entrada así como el tipo de matriz influenciaron ( $P \leq 0,05$ ) el grado de inactivación en las cepas de *Escherichia coli*, alcanzando su máximo nivel a una temperatura de entrada de 20 °C. La evolución de los recuentos viables durante el almacenamiento a 4,0 °C de muestras presurizadas fue similar en leche entera y desnatada, aunque la cepa *E. coli* ATCC 10536 no mostró diferencias significativas entre los días 0 y 9 de almacenamiento, mientras que la cepa *E. coli* CCUG 44857 mostró una tendencia decreciente de aproximadamente 0,3 unidades logarítmicas. En zumo de naranja, las cepas de *Escherichia coli* mostraron una mayor tendencia decreciente y la cepa CCUG 44857 fue más resistente al bajo pH, manteniendo recuentos altos para el día 27. En cepas de *Staphylococcus*, la temperatura de entrada, la matriz y la cepa influenciaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el nivel de inactivación, alcanzando sus mayores niveles a 20 °C. No se observaron daños subletales tras los tratamientos en ninguno de los casos. La evolución de los recuentos viables de ambas cepas mostró una fuerte tendencia decreciente después del día 3 de almacenamiento a 4,0 °C en zumo de naranja, mientras que la cepa *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 mostró una baja tendencia y una gran resistencia cuando fue inoculada en leche y presurizada a bajas temperaturas. El PAPH fue efectivo contra todas las cepas probadas a concentraciones por encima de 0,1 % y tiempos de exposición superiores a 10 minutos para todos los tipos de materias orgánicas estudiadas. Los tratamientos de UHPH de leche entera, desnatada y zumo de naranja a 300 + 30 MPa y una temperatura de entrada de 6 y 20 °C fueron eficientes para reducir los recuentos viables de *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 y *Staphylococcus carnosus* CECT 4491. La letalidad incrementó con la temperatura de entrada, sugiriendo un claro efecto de la temperatura en los valores de letalidad. El tipo de matriz influyó significativamente tanto la eficacia de los tratamientos de UHPH como la capacidad de crecimiento

durante el subsiguiente periodo de almacenamiento a bajas temperaturas. Los tratamientos de UHPH no causaron daños subletales aparentes en ninguno de los casos. La tecnología de las UHPH puede ofrecer una prominente alternativa para la pasteurización de la leche, zumos y otros alimentos líquidos combinado con la posibilidad de incrementar la temperatura de entrada de las muestras antes del proceso.



## ABSTRACT

### **Study of inactivación by ultrahigh-pressure homogenisation of microorganisms in liquid foods. Evaluation of the processes of cleaning and disinfection of the machine (Doctoral Thesis)**

The main objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the bacterial inactivation using Ultrahigh-pressure Homogenisation (UHPH) to 300 + 30 MPa of *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculated into whole milk, skim milk and into orange juice. Also, we intended to study the effect of inlet temperature of the milk and orange juice in the machine on the lethality and production of sublethal injuries in these microorganisms and its ability for survival, repair and growth in refrigerated storage after UHPH treatment. The objective of experiment 1 was to evaluate the bactericidal efficacy as decimal reduction (DR) of a mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide (PAHP) against strains of *Staphylococcus*, *Listeria* and *Escherichia coli* in presence of different organic matter types, exposure times and disinfectant concentrations. Also, we intended to study the resistance of pathogenic and non pathogenic strains of these groups of microorganisms in order to find valid surrogates to be used in the evaluation of disinfectants in order to develop an efficient procedure of cleaning and disinfection adapted to the UHPH machine. Experiment 2 had the purpose of evaluating the bactericidal efficacy of UHPH treatments against *Listeria innocua* ATCC 33090 inoculated into UHT milk and UHT orange juice. We also studied the effect of inlet temperature on the degree of inactivation of this microorganism and the capacity of this UHPH treatment to cause sublethal injuries when inoculated into whole milk and orange juice. We also determined its ability for survival, repair and growth under refrigeration after the UHPH treatment. The experiments 3 and 4 had as objective to evaluate the inactivation by UHPH of

*Escherichia coli* ATCC 10536 and *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 inoculated into UHT whole milk, UHT skim milk and UHT orange juice considering the effect of inlet temperature on the lethality values and the production of sublethal injuries in these strains. We also studied the ability of the microorganisms to repair and growth during storage at 4.0 °C after treatment. The experiment 5 had as purpose to evaluate the inactivation induced by UHPH of *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculate into UHT whole milk and UHT orange juice considering the effect of inlet temperature of sample on the lethality values reached and the production of sublethal injuries in these strains, as well as their ability to survive, repair and growth when stored at low temperatures after UHPH treatments. In the evaluation of the disinfectant, *Staphylococcus* spp. showed more resistance at low concentrations of disinfectant than strains of *E. coli* and *Listeria* spp. Egg was the organic matter with the greatest interfering capacity and orange juice was the one with least interfering capacity. However PAHP was effective (reductions > 5 log CFU/mL) in all cases from 0.1 % PAHP and 10 min of exposure. No statistical differences were found between pathogenic and non pathogenic strains in the same group. Concerning the effect of UHPH treatment, in *Listeria innocua* ATCC 33090 both the inlet temperature and the food matrix influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the level of inactivation reached, which was higher in whole milk with inlet at 20 °C. The UHPH treatment caused few or no sublethal injuries in *L. innocua*. During storage at 4.0 °C after treatments, counts increased by approximately two logarithmic units from days 0 to 9 in whole milk, while in orange juice counts diminished by approximately 2.5 logarithmic units from days 0 to 18. The level of inactivation was similar for both strains of *E. coli* and no sublethal injuries were detected after treatments in milk as in juice of orange. Both the inlet temperature and the type of milk influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the degree of inactivation reached in both strains of *E. coli*, being higher at 20 °C. The evolution of viable counts during storage at 4.0 °C was similar in whole and skim milk but although ATCC 10536 strain counts did not show significant differences between the days 0 and 9 of storage, the strain CCUG 44857

showed a decreasing tendency of approximately 0.3 logarithmic units. In orange juice the strains of *Escherichia coli* showed a greater decreasing tendency and the strain CCUG 44857 was more resistant at low pH, maintaining high viable counts until 27<sup>th</sup> of storage. In *Staphylococcus* strains the inlet temperature, food matrix and the strain influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the lethality level, which was higher with 20 °C of inlet temperature. We not observed sublethal injuries after treatments in any case. The evolution of viable counts showed for both strains a very strong decreasing tendency after 3 days of storage at 4 °C for orange juice, although *S. carnosus* CECT 4491 showed a low decreasing tendency and great resistance when was inoculated in milk and pressurized at low temperatures. The PAHP was effective against all strains tested at concentrations above 0.1 % and exposure times over 10 minutes for all the organic matters studied. The UHPH treatments of whole milk, skim milk and orange juice at 300 + 30 MPa at inlet temperatures of 6 and 20 °C were efficient to reduce the viable counts of *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491. The lethality increased with the inlet temperature, suggesting a clear effect of the temperature on the lethality values. The kind of matrix significantly influenced both the efficacy of the treatment and the growing capability during the subsequent storage period at low temperatures. Apparently UHPH treatment (300 + 30 MPa) did not cause significant sublethal injuries in any of the cases. UHPH technology may offer a promising alternative to the pasteurization of milk, juices and others liquid foods in combination with an increase of the inlet temperature of the sample before the process.



## RESUM

**Estudi de la inactivació per ultra alta pressió de homogeneització de microorganismes en aliments líquids. Valoració dels processos de neteja i desinfecció de l'equip (Tesi doctoral).**

L'objectiu principal d'aquesta Tesi Doctoral va ser avaluar la inactivació bacteriana per Ultra Alta Pressió de Homogeneització (UHPH) a 300 + 30 MPa de les soques bacterianes *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 i *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculades en llet sencera, llet desnatada i suc de taronja. També, vàrem intentar estudiar l'efecte de la temperatura d'entrada de la llet i el suc en la màquina d'alta pressió sobre la letalitat i producció de danys subletals en aquests microorganismes, així com l'habilitat d'aquests per a sobreviure, recuperar-se, i créixer en condicions de refrigeració després del tractament per UHPH. L'experiment 1 va tenir com objectiu avaluar l'eficàcia bactericida com a reducció decimal (DR) d'una barreja d'àcid peracètic i peròxid d'hidrogen (PAHP) contra soques de *Staphylococcus*, *Listeria* i *Escherichia coli* en presència de diferents tipus de matèria orgànica, temps d'exposició i concentració de desinfectant. També hem comparat la resistència de les soques patògenes i no patògenes d'aquests gèneres a la recerca de microorganismes alternatius per a usar en la valoració de desinfectants en el desenvolupament d'un procediment de neteja i desinfecció eficient adaptat a la màquina de UHPH. Una vegada s'ha ajustat i avaluat el procés de desinfecció l'experiment 2 va tenir com a finalitat avaluar l'eficàcia bactericida dels tractaments de UHPH contra *Listeria innocua* ATCC 33090 inoculada en llet sencera UHT i suc de taronja UHT, així com estudiar l'efecte de la temperatura d'entrada del producte en la màquina sobre la letalitat i la producció de danys subletals en aquest microorganisme i la seva habilitat de sobreviure, reparar-se i créixer emmagatzemava en refrigeració després del tractament de UHPH. Els experiment 3 i 4 van tenir com a objectiu avaluar

la inactivació per UHPH d'*Escherichia coli* ATCC 10536 i *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 inoculades en llet sencera UHT, llet desnatada UHT i suc de taronja UHT considerant l'efecte de la temperatura d'entrada de la llet i el suc en els valors de letalitat i la capacitat del tractament de produir danys subletals en aquestes soques. També hem estudiat l'habilitat d'aquests microorganismes de sobreviure, reparar-se i créixer durant la seva conservació a 4,0 °C després del tractament de UHPH. L'experiment 5 va tenir com a propòsit avaluar la inactivació induïda per la UHPH de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 i *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculats en llet sencera UHT i suc de taronja UHT, considerant l'efecte de la temperatura d'entrada de la mostra en els valors de letalitat i la producció de danys subletals en aquestes soques, així com la capacitat de sobreviure, reparar-se i créixer emmagatzemades a baixes temperatures després del tractament d' UHPH. En l'avaluació del desinfectant, *Staphylococcus* spp. el van mostrar major resistència a baixes concentracions de desinfectant que les soques d' *Escherichia coli* i *Listeria* spp. L'ou va ser la matèria orgànica amb major capacitat interferent mentre que el suc de taronja va presentar la menor capacitat interferent. No obstant això, el PAHP va ser efectiu (reduccions > 5 log UFC/mL) a concentracions superiors a 0,1 % i 10 minuts d'exposició en tots els casos. No es van trobar diferències estadístiques entre soques patògenes i no patògenes del mateix grup. En quant als tractaments de inactivació per UHPH, en *Listeria innocua* ATCC 33090 tant la temperatura d'entrada com el tipus de matriu van influenciar significativament ( $P \leq 0,05$ ) la inactivació la qual va ser major a una temperatura d'entrada de 20 °C. Els tractaments per UHPH no van causar danys subletals en *Listeria innocua*. Durant l'emmagatzematge a 4 °C després dels tractaments, els recomptes de *Listeria innocua* en llet van augmentar al voltant de 2 unitats logarítmiques entre els dies 0 i 9, mentre que en suc de taronja van disminuir 2,5 unitats logarítmiques entre els dies 0 i 18. El nivell d'inactivació va ser similar per a ambdues soques d' *Escherichia coli* en llet i no van ser detectats danys subletals després dels tractaments ni en llet ni en suc de taronja. Tant la temperatura d'entrada com el tipus de matriu van influenciar ( $P \leq 0,05$ ) el grau d' inactivació en les soques

d' *Escherichia coli*, arribant al seu màxim nivell a una temperatura d'entrada de 20 °C. L'evolució dels recomptes viables durant l'emmagatzematge a 4,0 °C de mostres pressuritzades va ser similar en llet sencera i desnatada encara que la soca ATCC 10536 no va mostrar diferències significatives entre els dies 0 i 9 d'emmagatzematge, mentre que la soca CCUG 44857 va mostrar una tendència decreixent d'aproximadament 0,3 unitats logarítmiques. En suc de taronja les soques d' *Escherichia coli* van mostrar una major tendència decreixent i la soca CCUG 44857 va mostrar major resistència al baix pH, mantenint recomptes alts el dia 27. En les soques de *Staphylococcus*, la temperatura d'entrada, la matriu i la soca van influenciar significativament ( $P \leq 0,05$ ) el nivell d' inactivació, que va ser màxima a 20 °C. No es van observar danys subletals després dels tractaments en cap dels casos. L'evolució dels recomptes viables d'ambdues soques va mostrar una forta tendència decreixent després del dia 3 d'emmagatzematge a 4,0 °C en suc de taronja, mentre que per la soca *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 va mostrar tendència i gran resistència quan va ser inoculada en llet i pressuritzada a baixes temperatures. El PAPH va ser efectiu contra totes les soques provades a concentracions per sobre de 0,1 % i a temps d'exposició superiors a 10 minuts per a tots els tipus de matèries orgàniques assajades. Els tractaments d'UHPH de llet sencera, desnatada i suc de taronja a 300 + 30 MPa a una temperatura d'entrada de 6 i 20 °C van ser eficients per a reduir els recomptes viables de *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 i *Staphylococcus carnosus* CECT 4491. La letalitat va incrementar-se amb la temperatura d'entrada, suggerint un clar efecte de la temperatura en els valors de letalitat. El tipus de matriu va influenciar significativament tant l'eficàcia dels tractaments d' UHPH com la capacitat de creixement durant el subsegüent període d'emmagatzematge a baixes temperatures. Els tractaments d' UHPH no van causar danys subletals aparents en cap dels casos. La tecnologia d' UHPH pot oferir una prometedora alternativa per a la pasteurització de la llet, suc i altres aliments líquids si s'incrementa la temperatura d'entrada de les mostres abans del procés.





**CAPÍTULO**

**PRIMERO**

---

**INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las enfermedades transmitidas por los alimentos han causado numerosos brotes en todo el mundo (Dontorou y col., 2003; Orden, y col., 2002; Todd, 1992). Una de las principales vías por las cuales se pueden contaminar los alimentos es a través del contacto con los equipos de procesamiento contaminados. Por lo tanto, es sumamente importante que estos equipos sean limpiados y desinfectados suficiente y regularmente (Luppens y col., 2002; Taormina y Beuchat, 2002). De este modo, un desinfectante efectivo puede ser utilizado y una concentración apropiada de este desinfectante pudiera ser aplicada en la industria de los alimentos para prevenir estos brotes. Usualmente, un programa de limpieza y desinfección efectivo es parte del proceso de higienización de los establecimientos alimentarios, previniendo con esto la acumulación de células microbianas y *biofilms* así como de partículas en la superficie de los equipos de procesamiento (Peng y col., 2002).

En los procesos de limpieza y desinfección de la industria alimentaria una concentración baja del desinfectante incrementa el riesgo de aparición de resistencias microbianas, mientras que una concentración alta incrementa los costos, el riesgo de contaminación del alimento y del medio ambiente (Luppens y col., 2002). Para aplicar un desinfectante adecuadamente se requiere que éste sea probado contra varias cepas microbianas en distintas condiciones que sean representativas de las condiciones prácticas de la industria alimentaria. El procedimiento utilizado para evaluar los desinfectantes en Europa consiste de tres fases. En la primera fase, la actividad del producto es evaluada con una prueba de suspensión. En la segunda fase, el producto desinfectante es probado dentro de condiciones representativas de las condiciones prácticas y, en la tercera fase, se realiza una prueba de campo dentro de las condiciones prácticas de uso en la industria alimentaria (Anónimo 1998 y Anónimo, 1997).

Existe un amplio espectro de agentes desinfectantes con diferentes actividades y tipos de acción contra los microorganismos patógenos en alimentos (Lundén y col.,

2003). Un producto desinfectante que es atractivo y de particular interés la mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno (PAHP), ya que sus componentes no son considerados particularmente contaminantes para el ecosistema además de no producir compuestos tóxicos al reaccionar con la materia orgánica presentes en los restos de los alimentos (Rossoni y Gaylarde., 2002). El PAHP ha sido empleado por la industria de alimentos y bebidas al ser considerado un fuerte agente oxidante efectivo como contra bacterias, levaduras, hongos y esporas de bacterias a bajas temperaturas y en presencia de materia orgánica (Blakistone y col., 1999; Fatemi y Frank., 1999).

El consumo de alimentos crudos se ha considerado como la causa más probable de infección en los diversos brotes que han ocurrido durante la última década en todo el mundo (Orden, y col., 2002). Un amplio espectro de microorganismos patógenos pueden contaminar los alimentos y causar enfermedades una vez que ellos y sus toxinas son consumidos. Microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 han sido reconocidos como patógenos transmitidos a través de los alimentos, capaces de producir enfermedades graves en poblaciones de riesgo. La leche, es un alimento sumamente perecedero y de una importancia especial como integrante de la dieta de personas jóvenes y de edad avanzada. Los atributos nutricionales de la leche, que la hacen una parte importante de la dieta del humano son los mismos componentes que sustentan el crecimiento de muchas bacterias patógenas asociadas con ella y productos lácteos (Wang y col., 1997). Leche y productos lácteos contaminados han sido asociados con brotes causados por *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* y, más recientemente, *Escherichia coli* O157:H7 (Altekruse y col., 1998; Sparling, 1998; Wang y col., 1997; Johnson y col., 1995;). Los zumos de fruta se han reconocido también como vehículos de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos desde hace muchos años (París, 1998), pero el incremento del consumo de zumos sin pasteurizar ha aumentado en todo el mundo en los últimos años, debido a que el tratamiento térmico se percibe como negativo para el sabor y calidad nutricional (McDonald y col., 2000), lo que ha traído como consecuencia un

número mayor de incidentes asociados con estos zumos en todo el mundo (Cook y col., 1998; Paris, 1998).

Entre este grupo de microorganismos transmitidos a través de los alimentos, *Listeria monocytogenes* tiene una especial habilidad para afectar a individuos inmunodeprimidos (Tauxe, 2002; Tarté y col., 1996). Los brotes de listeriosis han sido particularmente asociados con el consumo de leche cruda o productos lácteos elaborados a partir de leche cruda (Tauxe, 2002). Aunque este microorganismo no se ha relacionado con brotes causados por el consumo de zumos de frutas, se ha aislado en zumo de manzana sin pasteurizar (Sado y col., 1998), y es capaz de resistir las condiciones ácidas y el almacenamiento a bajas temperaturas en el zumo de naranja (Martínez-González y col., 2003). Por otro lado, *Escherichia coli* O157:H7 también ha sido asociada con brotes producidos por el consumo de leche y productos lácteos en la última década (Orden y col., 2002; Simmons, 1997; Sparling, 1998). Este microorganismo, conjuntamente con *Salmonella*, también ha sido implicado en brotes transmitidos por el consumo de zumo de naranja y de manzana sin pasteurizar (Cody y col., 1999; Cook y col., 1998; Paris, 1998). Estos recientes brotes han levantado conciencia acerca de la seguridad de consumir zumos de frutas sin pasteurizar. Varias cepas de *Escherichia coli* O157:H7 que han sido implicadas en brotes son además capaces de sobrevivir, aunque en un bajo número, en ambientes sumamente ácidos (pH 3,2 a 4,0) (Linton y col., 1999; Conner y Kotrola, 1995) como los que podemos encontrar en zumos de naranja y de manzana. Otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, aunque no se ha descrito que hayan causado brotes por consumo de zumo de frutas, son capaces de resistir las condiciones ácidas y el bajo pH en el zumo de naranja (Mothershaw y Jaffer, 2001), mientras que en el consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados con leche cruda, han sido implicados repetidamente en varios países con brotes causados por *Staphylococcus aureus* (De Buyser y col., 2001).

En la conservación de alimentos se utilizan métodos físicos, químicos y biológicos. De los métodos físicos, los tratamientos térmicos son los escogidos en la

mayoría de los casos para la conservación de la leche y otros muchos alimentos perecederos. El procesamiento térmico tiene una larga tradición, al ser un método económico y eficiente para lograr la inactivación microbiana, pero no es recomendable su utilización en alimentos con componentes sensibles al calor. Además, las temperaturas altas pueden provocar efectos indeseables tales como alteraciones del sabor, pardeamiento no enzimático ó desnaturalización de compuestos esenciales como ciertas vitaminas y proteínas (Diels y col., 2005; Diels y col., 2003; Vachon y col., 2002).

En los últimos 15 años, la tendencia de identificar lo más fresco como alimento de alta calidad ha generado un interés creciente por estos alimentos, y ha provocado que se realicen considerables esfuerzos de investigación para el desarrollo de nuevos procesos no térmicos para la conservación de alimentos, tales como la alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, pulsos de lumínicos y más recientemente la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) (Diels y col., 2004; Diels y col., 2003; Gervilla y col., 2000). Los tratamientos por alta presión son considerados como la tecnología emergente más prometedora para el procesamiento de alimentos gracias a las mejoras recientes en las máquinas de alta presión, que han permitido la introducción en el mercado de alimentos procesados por alta presión (Kheadr y col., 2002; Lucore y col., 2000)

La UHPH (también llamada alta presión dinámica en la literatura) es una nueva alternativa basada en los mismos principios de diseño que la homogeneización convencional, utilizada en la industria láctea para reducir el tamaño del glóbulo de grasa (1 a 10  $\mu\text{m}$ ), y prevenir el desnatado y la coalescencia de la grasa, alargando su vida útil durante el almacenamiento (Hayes y Kelly, 2003; Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002). En el proceso de homogeneización convencional, la leche es forzada a través de una válvula ajustable a presiones de hasta 50 MPa, que provocan un incremento en la velocidad del flujo y una posterior caída de presión que trae como consecuencia un efecto de cavitación, roce, turbulencia y colisión en la fase estacionaria, que combinado reducen el tamaños del glóbulo de grasa. También el

fluido es sometido a una depresión ultra rápida que produce un cambio de la temperatura, favoreciendo la formación de burbujas de aire (o cavidades) en el interior, formando un núcleo que crece produciendo la ruptura del glóbulo de grasa. (Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002; Guerzoni y col., 1999).

Presiones moderadas de homogeneización (20 a 50 MPa) se han usado extensamente en las industrias alimentarias, farmacéutica y cosmética para dispersar fases no micelares, estabilizar emulsiones y/o preparar productos con propiedades reológicas apropiadas (Diels y col., 2005; Hayes y Kelly, 2003). Sin embargo, las UHPH trabajan a presiones significativamente más altas (> 200 MPa), lo cual implica también la destrucción de grandes cantidades de microorganismos que puedan estar presentes en el alimento. Consecuentemente, parece ser un importante medio para reducir la carga microbiana inicial en un alimento mientras ayudamos a minimizar los daños en el producto provocados por el calor (Popper y Knorr, 1990). No obstante no se conoce aun suficientemente, los efectos de la UHPH en las células bacterianas, aunque los microorganismos son destruidos probablemente por la pérdida repentina de presión, la torsión, el roce y, más probablemente por la cavitación y las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de aire. El colapso en el líquido de tales cavidades podría transmitir varias fuerzas localizadas a partículas de superficie, o inclusive a las células microbianas (Guerzoni y col., 1999; Lanciotti y col., 1994; Popper y Knorr, 1990).

Algunas investigaciones previas con UHPH han descrito cambios en la morfología de la célula, así como la separación o rotura de la membrana citoplasmática. Los aumentos repentinos en la permeabilidad o ruptura de la membrana de la célula, tal como puede ocurrir bajo la aplicación de alta presión, puede ser la causa de la muerte celular (Kheadr y col., 2002; Vachon y col., 2002). Kheadr y col. (2002) reportaron que tras un tratamiento con 5 pases a 300 MPa, se observaron muy pocas células intactas de *Listeria monocytogenes*, y la mayoría de estas células aparecieron dañadas, con su contenido parcial o completamente vaciado. En otros estudios, Vannini y col. (2004) y Vachon y col. (2002) reportaron que los

tratamientos por UHPH causaron daños en la célula, cuya severidad aumento con el nivel de presión y el número de pases al cual se sometió la muestra. Los daños observados fueron más severos cuando la presión aumentó y estos incluían descargas del contenido citoplasmático de la célula, además, los investigadores mostraron que el grado de inactivación de los microorganismos dependió también de la cepa microbiana y del tipo o matriz alimenticia empleada.

En otros estudios (Diels y col., 2005; Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002), se ha evaluado la efectividad de la UHPH para inactivar microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, inoculados en diferentes matrices tales como soluciones de buffer fosfato salino (PBS) y leche, reportando estos investigadores diferencias significativas en los valores de letalidad cuando se ensayo con *Escherichia coli* usando diferente numero de pases. Por otro lado, Vachon y col. (2002) reportaron niveles de inactivación diferentes entre *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella enteritidis* inoculadas en PBS y presurizadas entre 100 y 300 MPa, demostrando que el género al cual pertenece la bacteria puede influenciar el nivel de inactivación alcanzado. No se encontraron referencias de estudios previos donde se compare la efectividad de la UHPH en diferentes matrices alimenticias como leche entera, desnatada y zumos de frutas. Además, la nueva generación de equipos de UHPH que poseen un sistema de doble válvula, fabricados con aleaciones que permiten procesar los productos a presiones por encima de 300 MPa, evitan incrementar el número de pases para alcanzar niveles de letalidad aceptables, hacen que esta tecnología tenga un futuro prometedor en los próximos años, requiriendo de estudios previos que permitan validar su utilización con diferentes alimentos y en diferentes condiciones de temperatura y presión.

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en nuestro estudio se han dividido en:

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la ultra alta presión de homogeneización de inactivar cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Listeria*, inoculadas en leche y zumo de naranja, estudiando la posterior evolución de sus recuentos durante la conservación de las muestras en refrigeración, así como el desarrollo de un procedimiento de higienización efectivo aplicable al equipo.

### 2.2. Objetivos específicos

Determinar la eficacia bactericida que tiene la aplicación de una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno para reducir la población de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Listeria monocytogenes* Scott A, en presencia de diferentes materias orgánicas y concentraciones de desinfectante usando un prueba de suspensión.

Evaluar la eficacia bactericida que tiene la aplicación de una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno para reducir la población de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 y *Listeria innocua* ATCC 33090 en un equipo de ultra alta presión de homogeneización usado para tratar muestras inoculadas de leche y zumo de naranja.



Determinar la efectividad del máximo nivel de ultra alta presión de homogeneización permitido por el prototipo (300 + 30 MPa) para inactivar *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 y *Listeria innocua* ATCC 33090, en diferentes matrices tales como leche entera, leche desnatada y zumo de naranja a diferentes temperaturas de entrada de la muestra (6 y 20 °C).

Evaluar la evolución de los recuentos de estos microorganismos inoculados en leche entera, leche desnatada y zumo de naranja, almacenados a 4,0 °C después de la presurización de 300 + 30 MPa, así como la generación de microorganismos lesionados por efecto del tratamiento y durante los días de almacenamiento.

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altekruse, S. F., Timbo, B. B., Mowbray, J. C., Bean, N. H., y Potter, M. E. (1998). Cheese-Associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacture practices protect consumer. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1405-1407.
- Anónimo. (1997). Chemical disinfectants and antiseptics-basic bactericidal activity-test method and requirement (phase 1). UNE-EN-1040., 1-30.
- Anónimo. (1998). Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - test method and requirement (phase 2 step 1). UNE-EN-1276., 1-35.
- Blakistone, B., Chuyate, R., Kautter, JR., Charbonneau, J., y Suit, K. (1999). Efficacy of Oxonia Active against selected spore formers. *Journal of Food Protection*, 62(3), 262-267.
- Cody, S. H., Glynn, M. K., Farrar, J. A., Cairns, K. L., Griffin, P. M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., Arlene, S. K., Lewis, J. H., Swaminathan, B., Bryant, R. G., y Vugia, D. J. (1999). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection of unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine*, 130(3), 202-209.
- Conner, D. E., y Kotrola, J. S. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 382-385.

- Cook, K., Dodds, T., Hlady, W., Wells, J., Barret, T., Punr, N., Lancette, G., Bodager, D., Toth, B., Genese, C., Highsmith, A., Pilot, K., Finelli, L., y Swerdlow, D. (1998). Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *The Journal of the American Medical Association*, 280(17), 1504-1509.
- De Buyser, M-L., Dufour, B., Maire, M., y Lafarge, V. (2001) implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 1-17.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michels, C. W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 281-291.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michels, C. W. (2004). Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1512-1517.
- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., y Michels, C. W. (2003). Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1), 55-62.
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A., y Levidiotou, S. (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 273-279.

- Fatemi, P., y Frank, J.F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*, 62(7), 761-765.
- Gervilla, R., Ferragut, V., y Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 674-682.
- Guerzoni, M. E., Vannini, L., Chaves López, C., Lanciotti, R., Suzzi, G., y Gianotti, A. (1999). Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat chesses. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 851-862.
- Hayes, M. G., y Kelly, A. L. (2003). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 297-305.
- Johnson, J. L., Rose, B. E., Sharar, A. K., Ramsom, G. M., Lattuada, C. P., y Mcnamara, A. M. (1995). Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with food-borne disease outbreak. *Journal of Food Protection*, 58(6), 597-603.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., y Fliss, I. (2002). Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12(5), 435-446.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., y Guerzoni, M. E. (1996). Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letter in Applied Microbiology*, 22(3), 165-168.

- Linton, M., McClements, J. M. J., y Patterson, M. F. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage in pressure-treated orange juice. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1038-1040.
- Lucore, L.A., Shellhammer, T. H., y Yousef, A. E. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 63(5), 662-664.
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., y Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 265-272.
- Luppens, S. B. I., Reij, M. W., Van der Heijden, R. W. L., Rombouts, F. M., y Abee, T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectant. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4194-4200.
- Martínez-González, N. E., Hernández-Herrera, A., Martínez-Chávez, L., Rodríguez-García, M. O., Torres-Vitela, M. R., Mota de la Garza, L., y Castillo, A. (2003). Spread of bacterial pathogens during preparation of freshly squeezed orange juice. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1490-1494.
- McDonald, C. J., Lloyd, S. W., Vitale, M. A., Petersson, K., y Innings, E. (2000). Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science*, 65(6), 984-989.

- Mothershaw, A. S., y Jaffer, T. (2001). Antimicrobial activity of foods with different physico-chemical characteristics. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 629-638.
- Orden J. A., Cid, D., Ruiz-Santa- Quiteria J. A., García, S., Martínez, S., y De la Fuente, R. (2002). Verotoxin – producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropatogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 93(1), 29-35.
- Paris, M. E. (1998). Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in salmonellosis outbreak. *Journal of Food Protection*, 61(3), 280-284.
- Peng, J-S., Tsai, W-C., y Chou, C-C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, 77(1-2), 11-18.
- Popper, L., y Knorr, D. (1990). Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, 44(7), 84-89.
- Rossoni, E. M. M., y Gaylarde, C.C. (2002). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 81-85.
- Sado, P. N., Jinneman, K. C., Busby, G. J., Sorg, S. M., y Omiecinski, C. J. (1998) Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurised apple juice using rapid test kits. *Journal of Food Protection*, 61(9), 1199-1202.

- Simmons, N. A. (1997). Global perspective on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* spp.: UK views. *Journal of Food Protection*, 60(11), 1463-1465.
- Sparling, P. H. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks in the United States, 1982-1996. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213(12), 1733.
- Taormina, P.J., y Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 71-80.
- Tarté, R., Murano, E. A., y Olson, D. G. (1996). Survival and injury of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii* in ground pork following electron beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 59(6), 596-600.
- Tauxe, R. V. (2002). Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 31-41.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L. Guiraud, J. P., y Cheftel, J. C. (2003). High-pressure of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427-439.
- Todd, E. C. D. (1992). Foodborne disease in Canada – a 10 – year summary from 1975 to 1984. *Journal of Food Protection*, 55(2), 123-132.
- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., y Fliss, I. (2002). Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65(2), 345-352.

Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., y Guerzoni, M. E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 123-136.

Wang, G., Zhao, T., y Doyle, M. P. (1997). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 60(6), 610-613.



**CAPÍTULO**

**SEGUNDO**

---

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1. PROCESOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Aunque tradicionalmente la limpieza y la desinfección han sido consideradas como conceptos sinónimos, la realidad es bien distinta, ya que se trata de operaciones complementarias pero apreciablemente diferentes. La limpieza es el proceso mediante el cual logramos la eliminación de la suciedad en las superficies tratadas, que significa a la vez la destrucción de la fracción principal de gérmenes presentes en estas superficies (Kahrs, 1995; Mateos, 1995). Por otro lado, la desinfección es la destrucción de gérmenes infecciosos remanentes o la reducción de los mismos a niveles que no constituyan un peligro para la salud pública (Kahrs, 1995; Mateos, 1995), no conllevando implícito un proceso de limpieza previa. En el proceso de desinfección se produce una reacción entre el agente infeccioso y el producto desinfectante mediante el cual se destruye o reduce el agente infeccioso y numerosos saprofitos, pudiendo ser empleados para alcanzar tal fin medios físicos, como calor (ebullición, pasteurización), radiaciones UV, ultrasonidos, filtración de aire o por medio de sustancias químicas denominadas desinfectantes (Herruzo, 2000; Mateos, 1995).

### 1.1 Objetivos de los procesos de limpieza y desinfección

Los objetivos de la limpieza y desinfección de las superficies en contacto con los alimentos son distintos. Por un lado, la limpieza busca cumplir con exigencias estéticas en la instalación alimentaria, eliminando los residuos macroscópicos presentes (Mateos, 1995), restablecer el normal funcionamiento de los utensilios y las instalaciones tras su actividad en el proceso de producción, asegurar la calidad óptima de los alimentos frente a contaminaciones químicas y prolongar la vida útil de instalaciones y utensilios que estén en contacto con los alimentos. La desinfección a su vez persigue obtener una calidad óptima del alimento desde el punto de vista microbiológico, reduciendo al mínimo posible la carga microbiana en las instalaciones

y los utensilios y con esto asegurar la salud del público consumidor (Collado y col., 1998). Además de lo expuesto, cabe destacar que la limpieza es esencial para obtener una buena desinfección, ya que por lo general los restos de materia orgánica presentes en las superficies de los utensilios y las instalaciones ejercen un fuerte efecto interferente en la actividad germicida de los productos desinfectantes (Mullerat y col., 1995; Van de Weyer y col., 1993), razón por la cual los dos procesos se encuentran íntimamente ligados y se engloban dentro de un mismo termino “higienización”, que puede definirse como el tratamiento que reduce la población microbiana a niveles que no sean perjudiciales para la salud pública. Su diferencia con la desinfección es que la higienización implica una acción de limpieza, cosa que no es imprescindible en la desinfección (García, 1988). Así pues, el programa o plan de higienización contempla las operaciones de limpieza y desinfección conjuntamente.

## **2. PROGRAMAS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

### **2.1. Importancia de la implementación de un programa de limpieza y desinfección**

En la actualidad la centralización de la producción de los alimentos requieren de una elaboración, manipulación, conservación y transporte de cantidades, cada día más importantes de materias primas y productos envasados, y el desplazamiento continuo y masivo de personas (Vázquez y col., 2003). Esto hace que el riesgo de trastornos de origen alimentario haya aumentado considerablemente en los últimos años. En estas circunstancias las industrias deben mantenerse limpias por los medios más apropiados y, asimismo, las dependencias y equipos deben someterse a desinfección, desinsectación y desratización con la periodicidad necesaria. Así pues, la industria alimentaria requiere de la implementación de un sistema adecuado de limpieza y desinfección en conjunto mediante un programa profiláctico de todas las instalaciones

que le permita garantizar las condiciones higiénico sanitarias de los alimentos elaborados y cumplir con la normativa técnico sanitaria vigente (Gómez-Exojo, 1994).

Los programas de higienización son diseñados para facilitar el uso eficiente del agua y los agentes químicos implicados, permitiendo seleccionar los productos desinfectantes para ser usados en las condiciones más óptimas, afianzando la seguridad de los operadores, maquinarias y productos, hacerlo de fácil manejo, reduciendo las labores manuales y los costos de la limpieza. En esta vía, un nivel adecuado de higienización debería ser conseguido económicamente y con la debida contemplación de la contaminación ambiental. El programa de higienización debe tener claramente ilustrado; cada estado del proceso de limpieza y desinfección: toda la información pertinente en seguridad, puntos claves de inspección y medios para su valoración (Holah, 1995b). La minuciosidad de la limpieza que precede la desinfección es el factor más importante en el programa, ya que de ella depende en gran parte que el desinfectante tenga pocas interferencias y sea eficaz en la eliminación de todos los microorganismos remanentes en las superficies y equipos (Kahrs, 1995).

## **2.2. Factores a considerar en la implementación de un programa de limpieza y desinfección**

La implementación de programas adecuados de limpieza y desinfección en la industria alimentaria persigue controlar las enfermedades transmitidas por los alimentos y obtener productos de calidad desde el punto de vista microbiológico (Luppens y col., 2002). Los consumidores, por su parte, esperan disponer de alimentos de calidad exentos de gérmenes patógenos y/o toxinas de modo que no representen ningún riesgo para su salud. Esto requiere, para la satisfacción de ambas partes, la implementación de un programa adecuado de limpieza y desinfección (Higienización) en los equipos, utensilios e instalaciones implicadas en la producción de alimentos (Griffin y Tauxe, 1991).

Un programa típico de higienización en su implementación debe tener en cuenta factores tales como el tipo de suciedad a tratar, incluir una descripción de los equipos y de los productos químicos a utilizar. También, información y características de los equipos utilizados para la higienización; la completa descripción del proceso de limpieza que incluya su periodicidad, grupo de trabajadores responsable y los puntos de valoración del procedimiento de higienización (Gómez-Exojo, 1995; Holah, 1995b). Los programas de limpieza y desinfección pueden diferir significativamente de acuerdo a la naturaleza del equipo, características de los depósitos de suciedad en las instalaciones y equipos, y del uso al cual sea destinado posteriormente el producto originado del proceso de fabricación (Gilbert y Brown, 1995). Un buen programa se debe adecuar a las características de los residuos generados en el proceso de producción, de forma tal que pueda garantizar un proceso de limpieza que permita remover todos los residuos macroscópicos para que el desinfectante aplicado posteriormente logre reducir al mínimo, sin ninguna interferencia, a los microorganismos presentes en las superficies. La composición de los residuos o suciedad depende ante todo de la composición y del tipo de alimento que se esté procesando, además de los métodos de tratamiento y elaboración a que se someta la materia prima, por lo que es recomendable adaptar el proceso de limpieza y desinfección al tipo de residuos generados para obtener resultados óptimos (Collado y col., 1998; Visser y Jeurink, 1997).

Los residuos encontrados en las superficies de equipos y utensilios empleados en la elaboración de los alimentos pueden ser muy variados (Collado y col., 1998), pero incluyen por lo general, azúcares, proteínas, grasas y minerales, los cuales dependiendo del tratamiento aplicado en la transformación pueden formar estructuras más complejas entre sí, tales como películas o costras, las cuales se ven favorecidas por procesos de desnaturalización, caramelización y polimerización en los equipos, haciendo más difícil su posterior remoción con los tratamientos de limpieza convencionales, favoreciendo con esto la formación de *biofilms* y complicando la desinfección posterior (Grabhoff, 1997).

En la selección del desinfectante se deben tener en cuenta factores como el tipo y cantidad de microorganismos que se desean eliminar, tipo de instalación a desinfectar, el nivel de desinfección que se desee alcanzar, la materia orgánica y el nivel de limpieza previo a la aplicación del producto. En función de estos factores se determina el producto o productos necesarios además de sus posibles condiciones de aplicación (concentración, tiempo y temperaturas utilizadas) (Gallardo y col., 2002). Además, actualmente es importante considerar que el producto no sea potencialmente contaminante para el medio ambiente, sea poco tóxico para los operarios y manipuladores y que sea poco corrosivo para equipos e utensilios. Una vez elegido el desinfectante es recomendable realizar las evaluaciones *in vitro* del producto (Anónimo, 1997), para poder establecer la capacidad del desinfectante elegido en diferentes condiciones de concentración, tiempo y temperaturas de aplicación contra posibles microorganismos presentes en el alimento (Gallardo y col., 2002).

### **2.3. Etapas del programa de limpieza y desinfección**

Una vez superadas las evaluaciones de la capacidad del producto del desinfectante elegido, se debe adecuar un proceso de limpieza y desinfección para realizar las pruebas *in vivo*, y el cual en forma general debe contemplar las siguientes etapas (Holah, 1997; Salvat y Colin, 1995):

- Preenjuague: se trata de realizar una limpieza previa con agua, para eliminar la suciedad más grosera y la materia orgánica visible. Puede usarse agua fría o caliente siendo esta última de especial interés para suciedades grasientas y para eliminar parte de la carga microbiana en la superficie.
- Aplicación del detergente: se realizará mediante el sistema adecuado a cada caso particular. Esta fase es la responsable de disolver y solubilizar la suciedad para facilitar su desprendimiento de las superficies tratadas.
- Enjuague: se realizará mediante agua potable abundante, a media y baja presión para evitar nebulizaciones.

- Aplicación del desinfectante: una vez realizado el proceso de limpieza como tal, se procede a aplicar un desinfectante, para inactivar los microorganismos que no se hayan eliminado en el proceso de detergencia y en la fase de aclarado.
- Enjuague: se realiza con el objetivo de eliminar los residuos de desinfectante y evitar que estos contaminen a los alimentos.
- Secado: en la medida de las posibilidades se realizará una etapa de secado, porque si no el agua, además de favorecer el crecimiento bacteriano, puede servir de vehículo diseminador si hubiese quedado algún microorganismo.

En la búsqueda de un proceso de limpieza y desinfección ajustado a las necesidades de cada empresa e instalación, se deben establecer los tiempos y concentraciones mínimas efectivas de productos que garanticen que los niveles de la carga microbiana remanente en utensilios, equipos e instalaciones al final del proceso de higienización, no represente ningún peligro para la salud, además, de garantizar una calidad óptima del alimento generado en estos procesos de transformación (Holah, 1995c). Las personas responsables de la aplicación del programa de limpieza y desinfección deben reevaluar regularmente la lógica que rige sus programas desde el punto de vista científico y técnico, además de tener objetivos claros para cada operación en cada contexto particular (Kahrs, 1995). Para alcanzar ajustar y personalizar un programa de limpieza y desinfección, es conveniente elaborar Protocolos Normalizados de Trabajo (PNT), en especial para cada área de trabajo y para cada equipo en concreto. Estos deben ser revisados periódicamente y se debe nombrar un responsable encargado de éstos procedimientos de modo que se cumplan rigurosamente los procedimientos establecidos en el PNT en cada área de la instalación (Gómez-Exojo, 1994).

### 3. PRODUCTOS DESINFECTANTES

#### 3.1. Definición

Un desinfectante, según la administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA), es una sustancia que depositada sobre un material vivo o inerte destruye en 10 a 15 minutos todos los gérmenes patógenos, alterando lo menos posible el substrato donde residen y abarcando esta destrucción todas las formas vegetativas de bacterias hongos y virus. Actualmente se tiende a denominar “germicidas” a productos que actúan tanto *in vivo* como sobre material inerte, y se reserva el termino desinfectante a los productos que solo deben aplicarse sobre material inerte (Herruzo, 2000; Blancou, 1995).

#### 3.2. Tipos y mecanismos de acción

Existe una gran variedad de compuestos con capacidad desinfectante que se utilizan desde tiempos antiguos. Parte de estos principios fueron descubiertos en el siglo XIX, como es el caso de creolina, los fenoles, el peróxido de hidrógeno, el formaldehído, los cresoles, etc. Otros compuestos son de fecha mas reciente tales como los fenoles clorados, el amonio cuaternario, el oxido de etileno, las amidinas, los iodóforos, ácido paracético y el glutaraldehido, entre otros (Hugo, 1995). Los desinfectantes modernos son complejas formulaciones de sustancias químicas, jabones, detergentes y componentes, que ayudan a la penetración de los principios activos, pudiendo formar parte de estos productos uno o varios desinfectantes, que puedan lograr un efecto sinérgico y complementario con el fin de que la formulación tenga un amplio espectro de actividad (Kahrs, 1995).

Los compuestos, mezclas y productos desinfectantes naturales o sintéticos utilizados en el mundo son demasiado numerosos para poder ser descritos individualmente. Por otro lado, las listas de desinfectantes y agentes de saneamiento



autorizados en cada país pueden variar y se vuelven rápidamente caducas al desarrollarse constantemente nuevos productos (Kahrs, 1995). Solo en Europa existen más de 250 agentes químicos, de los cuales aproximadamente más de 100 se usan comúnmente como productos desinfectantes los cuales pueden agruparse para su estudio de acuerdo a principios tales como modos de acción y principios activos principalmente (Jeffrey, 1995; Maris, 1995).

En general, los desinfectantes pueden actuar frente a los microorganismos de dos diferentes formas: inhibiendo el crecimiento (Bacteriostasis, fungiostasis) o produciendo una acción letal (efecto bactericida, fungicida y viricida). Solo el efecto letal es de interés en la desinfección, ya que la letalidad del microorganismo es el objetivo deseado en el proceso de desinfección. Los modos de acción frente a los microorganismos, por los cuales se pueden agrupar los desinfectantes, suelen ser variados, pero los principales son: Acción en la membrana externa de la pared celular, acción en la pared bacteriana, acción en la membrana citoplasmática, acción en el metabolismo energético, acción en el citoplasma y el núcleo y acción sobre las esporas bacterianas (Maris, 1995).

La lista de sustancias desinfectantes contiene un amplio rango de compuestos químicos, que van desde simples moléculas inorgánicas, tales como hidróxido de sodio a moléculas relativamente complejas, como compuestos de amonio cuaternario. Existe un amplio espectro de agentes desinfectantes con diferentes actividades y tipos de acción contra los microorganismos patógenos en alimentos (Lundén y col., 2003), que pueden ser agrupados de acuerdo a su principio activo en: Compuestos de amonio cuaternario, fenoles, compuestos que liberan halógenos, fenoles halogenados, aldehídos, biguanidinas y biguanidinas poliméricas, compuestos anfóteros, compuestos a base de yodo, alcoholes, ácidos, compuestos basados en peroxigénicos, álcalis y misceláneos microbicidas (Jeffrey, 1995).

### 3.3. Compuestos peroxigénicos

Dentro de los compuestos basados en peroxigénicos, un producto desinfectante que es atractivo y de particular interés es la mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno (PAPH), el cual ha sido empleado con frecuencia por la industria de alimentos y bebidas, al ser considerado un fuerte agente oxidante efectivo contra bacterias, levaduras, hongos y esporas bacterianas a bajas temperaturas y en presencia de materia orgánica (Blakistone y col., 1999; Fatemi y Frank., 1999). Los compuestos peroxigénicos son poco contaminantes para el ecosistema y no producen compuestos tóxicos al reaccionar con la materia orgánica en los restos de los alimentos (Rossoni y Gaylarde, 2002). Dentro de estos compuestos, el peróxido de hidrógeno posee buenas propiedades antibacterianas y puede ser utilizado en formulaciones de desinfectantes a concentraciones del 5 al 20 %. Por otro lado, se considera que no tiene buena capacidad fungicida y los microorganismos con capacidad de sintetizar catalasa son resistentes a este producto a bajas concentraciones (Jeffrey, 1995). Otro inconveniente que presentan los desinfectantes basados en compuestos peroxigénicos es que son muy reactivos, inestables y se destruyen por álcalis. Para incrementar su estabilidad se le ajusta el pH a 5 aproximadamente y se le adicionan fosfatos. A pesar de estas limitaciones e inconvenientes las propiedades antimicrobianas del peróxido de hidrógeno han sido ampliamente reconocidas y se utiliza intensivamente en la esterilización de empaques de cartón usados para leche y en máquinas envasadoras (Jeffrey, 1995).

El peróxido de hidrógeno también, se usa diluido a diferentes concentraciones como desinfectante tópico en productos de consumo, y en forma de vapor como agente esterilizante de equipos médicos (Klapes y Vesley, 1990) y como antiséptico en sistemas y materiales de empaque (Wang y Toledo, 1986). Este producto está clasificado y reconocido como generalmente seguro para su uso en productos alimenticios como agente blanqueador, oxidante, reductor y antimicrobiano. Tres aplicaciones son aprobadas por la administración de drogas y alimentos de los Estados

Unidos (FDA). En primer lugar, el tratamiento de la leche para su uso en quesos, en segundo lugar, la preparación de suero modificado y por último, la preparación de almidón. Además de estas aplicaciones descritas, el peróxido de hidrógeno ha sido utilizado en la preservación y control de *Salmonella* en vegetales y frutas frescas (Dike, 2004), además de vegetales salados, moras, melones frescos y en uvas poscosecha entre otros (Gerald y Gilbert, 1998).

Ciertos ácidos orgánicos con capacidad bactericida y viricida son utilizados como desinfectantes en plantas transformadoras de alimentos, pues son menos tóxicos y menos corrosivos que los ácidos inorgánicos tales como el clorhídrico y el sulfúrico. Dentro de los orgánicos, el ácido acético se obtiene fácilmente ya que se encuentra en el vinagre al 4 %. Ha sido utilizado al 2 % para reducir el contenido microbiano en frigoríficos. Además, ha sido empleado con otros ácidos orgánicos tales como el cítrico, el láctico, el fórmico y el propiónico en plantas frigoríficas productoras de carne bovina y de ave (Kahrs, 1995). Por otro lado, ácidos como el acético han sido modificados y mezclados con otros productos en la búsqueda de nuevas formulaciones desinfectantes más eficientes frente a las formas vegetativas de los microorganismos y sus formas resistentes (esporas).

Un producto desinfectante considerado dentro de los compuestos basados en peroxigénicos es el ácido peracético, el cual ha encontrado una amplia utilización en la industria de los alimentos y lechería. Este se presenta generalmente en forma de una mezcla con ácido acético y peróxido de hidrógeno, denominándose genéricamente como ácido peracético y para algunos fabricantes como oxonia activo. La mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno (PAHP) tiene un olor penetrante pero es capaz de eliminar todo tipo de microorganismo, incluyendo esporas. Además, es un producto activo en presencia de materia orgánica interferente (Blakistone y col., 1999; Jeffrey, 1995).

El PAHP, además de su amplio espectro es un producto de interés ya que sus componentes se consideran poco contaminantes para el ecosistema además de no producir compuestos tóxicos al reaccionar con la materia orgánica en las superficies

de los equipos (Rossoni y Gaylarde, 2002; Stampi y col., 2002). El modo de acción de cada uno de los componentes de PAHP es diferente. Por una parte, el ácido peracético produce una desnaturalización de las proteínas y los lípidos del microorganismo induciendo una desorganización de la membrana celular. Una hinchazón de la membrana puede dar lugar a una saturación de hidrogeniones los cuales atraen agua. En algunas formulaciones esta acción dificulta la disociación del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, por su parte, juega un papel importante en la degradación de la célula bacteriana (Maris, 1995). Mas específicamente el PAHP actúa oxidando radicales libres (e.g. hidroxil radicales) de enzimas y proteínas del grupo thiol (Denyer, 1995). En presencia de agentes oxidantes tales como los peróxidos, bacterias como *E. coli* se defienden a través de la producción de enzimas que destruyen el agente oxidante antes que la degradación bacteriana tenga lugar. Las moléculas oxidadas son más sensibles que otras moléculas, y se ha sugerido que un sistema de restauración de las células puede entrar en efecto bajo la acción de un agente oxidante como el peróxido (Maris, 1995).

Por lo general, la mayoría de los desinfectantes tienen una habilidad limitada para penetrar las capas protectoras de los polímeros microbianos que constituyen los *biofilms*. Los *biofilms* están constituidos por grupos de células microbianas con una red de canales o espacios internos cubiertos por una matriz extracelular de polisacáridos y glicoproteínas, lo que los hace sumamente resistentes a la acción de los desinfectantes (Carballo, 2001; Christensen, 1989). La presencia de *biofilms* y materia orgánica reducen la eficiencia de los desinfectantes convencionales tales como el hipoclorito, el amonio cuaternario y el ácido aniónico (Lee y Frank, 1991; Frank y Koffi, 1990). El PAHP, por su parte ha demostrado una buena capacidad para penetrar la matriz extracelular e inactivar microorganismos en *biofilms* mixtos en diferentes superficies (Ntsamaessomba y col., 1997; Mosteller y Bishop, 1993). Además de todas las características deseables como desinfectante ya descritas, se ha reportado que el PAHP fue el producto desinfectante más efectivo entre varios productos probados, siendo capaz de inactivar *biofilms* formados en superficies de acero inoxidable de

bacterias Gram positivas, negativas esporas y hongos (Holah, 1995a; Holah y col., 1990). Por otra parte, el PAHP ha sido considerado como un desinfectante esporicida a bajas temperaturas y en presencia de materia orgánica. De este modo, es capaz de producir inactivación de bacterias del género *Bacillus* en tiempos de 15 segundos a 15 minutos, a concentraciones del 0,05 al 3,0 % a temperatura ambiente (Blakistone y col., 1999). Los fabricantes, conociendo todas las bondades de este producto desinfectante, sacaron provecho de la eficacia de PAHP a partir de 1975, con la comercialización en Europa de formulaciones a base de estos productos con la adición de estabilizantes, que fueron introducidas posteriormente en los Estados Unidos en 1986. Las formulaciones más recientes de esta mezcla en el mercado son el Oxonia Activo, el cual es una mezcla equilibrada de peróxido de hidrógeno, ácido acético y peracético y ácido 1-hidroxitilidene-1,1- difosfonico, con excelentes propiedades bactericidas de amplio espectro y con pocos problemas de estabilidad (Blakistone y col., 1999).

### **3.4. Factores que afectan la eficacia de los productos desinfectantes**

La eficacia de los productos desinfectantes puede ser influenciada por múltiples factores dentro de los cuales la concentración, temperatura de aplicación y tiempo de contacto son de primera importancia (Bruins y Dyer, 1995). Por otro lado, además de las características químicas del producto y la temperatura, la forma de aplicación, la presencia de materia orgánica, los tipos de superficies y el tipo de microorganismo contaminante serán determinantes en la eficacia del producto desinfectante (Gallardo y col., 2002). Según Holah y col., (1995c), los factores con mayor influencia en la capacidad desinfectante son las condiciones de crecimiento y tipo de microorganismo, sustancias interferentes, pH, temperatura, tiempo de contacto y concentración de desinfectante.

### 3.4.1. Condiciones de crecimiento y tipo de microorganismo

Idealmente un desinfectante debe tener un amplio espectro de actividad contra virus, bacterias, hongos y esporas. Las formas microbianas más resistentes son las esporas, seguidas por los hongos, los bacilos Gram negativos, los cocos y por último los bacilos Gram positivos. Los virus grandes con capa lipídica son más sensibles que los pequeños sin esta cubierta (Herruzo, 2000).

El desinfectante debe proveer una buena actividad biocida en diferentes condiciones y estados de crecimiento de los microorganismos. Es conocido que el microorganismo es más resistente a los desinfectantes cuando está adherido a las superficies o formando *biofilms* que cuando está en suspensión (Luppens y col., 2002). Esta estructura compleja donde se encuentran los microorganismos en los *biofilms* ejerce un efecto protector e interferente y dificulta la acción bactericida de los productos desinfectantes (Carballo, 2001; Fatemi y Frank, 1999; Holah, 1995c). Por otro lado, cuando la carga microbiana es alta se requiere una mayor concentración de desinfectante o un mayor tiempo de exposición para conseguir un nivel aceptable de desinfección, de ahí la necesidad y la recomendación de limpiar siempre la superficie previo a la aplicación del desinfectante pues reducirá en parte la carga microbiana y facilitará la acción del desinfectante (Herruzo, 2000).

### 3.4.2. Sustancias interferentes

La eficacia de los productos desinfectantes se reduce en presencia de materia orgánica e inorgánica, principalmente debido a reacciones químicas y reacciones no específicas. La materia orgánica puede reaccionar no específicamente con el desinfectante consumiendo parte del producto aplicado, lo que hace disminuir su concentración efectiva evidenciándose una pérdida clara de la potencia del producto (Holah, 1995b). Algunos desinfectantes también pueden ser afectados por materiales inorgánicos tales como sales presentes en el agua de dilución (Holah, 1995b; Holah,

1995c). La presencia de materia orgánica en la superficie a desinfectar puede afectar el proceso de desinfección de dos formas principalmente. En primer lugar puede proteger a los microorganismos y por el otro puede disminuir la acción biocida o inactivar el desinfectante, por ello es recomendable limpiar siempre las superficies previas al proceso de desinfección. Además de la materia orgánica existen otros elementos tales como jabones, corcho, goma, etc, que pueden reaccionar con el producto desinfectante y neutralizarlo (Herruzo, 2000).

### **3.4.3. El pH**

Los desinfectantes pueden ser afectados por el pH del agua donde se diluyen, por lo que solo deben ser utilizados en el rango de pH recomendado por los fabricantes (Holah, 1995b). El pH afecta tanto la carga superficial de los microorganismos como el grado de ionización del producto. Algunos desinfectantes ampliamente utilizados como el cloro se presentan en su forma ionizada (HOCl) o cloro libre a un rango de pH de 3 a 7,5 por lo que tienen una muy fuerte actividad desinfectante, mientras que a pH superior a 7,5 no hay cloro libre, presentando una actividad biocida cien veces menor. Las formas ionizadas de los productos son capaces de atravesar más fácilmente las membranas biológicas y por lo tanto son más efectivos en el proceso de desinfección (Holah, 1995c).

### **3.4.4. Temperatura**

Los desinfectantes deberán ser efectivos al más amplio rango posible de temperaturas y ser aplicados entre los límites de temperaturas indicados por los fabricantes. Temperaturas mínimas de 5 °C, que son temperaturas de refrigeración y máximas de 55 °C son comunes en la industria. Así mismo, el desinfectante deberá mantener su nivel biocida a temperatura ambiente (Holah, 1995c). En la mayoría de los productos desinfectantes al incrementar la temperatura aumenta su eficacia hasta

alcanzar un punto máximo de actividad desinfectante, lo que se considera la temperatura óptima de aplicación, punto a partir del cual el incremento de la temperatura produce una pérdida de potencia biocida como ocurre con el peróxido de hidrógeno al hacerse inestable a temperaturas superiores de 45 °C (Gerald y Gilbert, 1998).

Para la mayoría de los productos desinfectantes, un incremento de 10 °C supone un aumento del doble de su capacidad bactericida (Herruzo, 2000), pero para productos como el fenol este mismo incremento representa un aumento de 5 veces más su eficacia desinfectante. La temperatura del agua juega un papel importante en el proceso de limpieza y desinfección, al ser calentada tiene importantes aplicaciones desinfectantes en plantas de transformación, además de ser el vehículo de los productos desinfectantes. Cuando el agua alcanza altas temperaturas, por si sola es capaz de emulsificar las grasas de los residuos en las superficies, desprender las partículas orgánicas y producir una breve acción bactericida antes que la superficie se enfríe (Gallardo y col., 2002; Kahrs, 1995).

#### **3.4.5. Tiempo de contacto**

Para que los desinfectantes en los procesos de desinfección sean efectivos en primer lugar deben encontrar y atravesar la envoltura celular hasta su sitio de actuación específico o lugar diana, donde se desencadenan las reacciones que inician la destrucción del microorganismo. Un tiempo de contacto suficiente del desinfectante con la célula es por lo tanto requerido y es un punto crítico para asegurar la desinfección y alcanzar el propósito general de la mayoría de los desinfectantes, que es reducir la población bacteriana en el orden de 5 unidades logarítmicas en 5 minutos de contacto en una prueba de suspensión (Holah, 1995b; Holah, 1995c).

Los tiempos de contactos pueden ser incrementados dependiendo de las características del desinfectante. En productos en forma de espumas o geles los tiempos de aplicación suelen ser superiores a 5 minutos, alcanzando tiempos de 10 a



15 minutos para espumas y superiores de 15 minutos para geles (Holah, 1995c). Tiempos superiores pueden ser requeridos para utensilios o piezas pequeñas de algunos equipos de difícil acceso para el desinfectante, donde además se requiera una aplicación manual para lograr una desinfección correcta. Por otro lado, el tiempo de aplicación está directamente relacionado con la concentración de desinfectante aplicada. Cuando se utilizan concentraciones bajas, por lo general, los tiempos de aplicación suelen ser mayores y viceversa estando para la mayoría de los casos entre 10 y 15 minutos (Herruzo, 2000).

#### **3.4.6. Concentración**

Cuando se aplica una preparación de desinfectante sobre una superficie o en una prueba de suspensión, la relación entre muerte microbiana y concentración de desinfectante no es lineal, pero usualmente sigue una típica curva de muerte biológica sigmoidea (Holah, 1995b). En esta curva las poblaciones microbianas se resisten a la muerte a bajas concentraciones de desinfectante, pero cuando la concentración se incrementa este punto se alarga hasta que la mayoría de la población sucumbe al desinfectante. Más allá de este punto los microorganismos ponen mayor resistencia para morir (resistencia completa o protección física) y una proporción puede sobrevivir sin tener en cuenta el incremento de la concentración. Esto es importante, por lo tanto, para la utilización de los desinfectantes dentro de los rangos de concentración recomendados por los fabricantes y tener el conocimiento que cambios de estas concentraciones pueden no incrementar el efecto o no dar el aumento en la acción biocida deseada (Holah, 1995c).

#### **3.5. Valoración de la eficacia de los desinfectantes en pruebas de suspensión**

Para aplicar un desinfectante adecuadamente se requiere que previamente este sea probado contra varias cepas microbianas en distintas condiciones que sean

representativas de las condiciones de uso de la industria alimentaria (Gallardo y col., 2002). En el proceso de desinfección una concentración baja del producto desinfectante incrementa el riesgo de adquisición de resistencia, y una concentración alta incrementa los costos, el riesgo de contaminación del alimento y del medio ambiente (Luppens y col., 2002). Las evaluaciones de la eficacia de los productos desinfectantes se consideran de suma importancia, y por ello en los diferentes países se han establecido normativas y controles para valorar la eficacia y poder determinar si el desinfectante cumple o no los requisitos mínimos para que pueda ser comercializado con total garantía (Anónimo, 1998a; Anónimo, 1998b, Anónimo, 1997; Collado, 1994). En las valoraciones se debe tomar como referencia el comportamiento de los desinfectantes frente a bacterias representantes de diferentes grupos con características diferentes que nos permitan valorar la verdadera eficacia y la actividad bactericida frente a estos microorganismos que posee el producto desinfectante (Gallardo y col., 2002; Anónimo, 1998a; Anónimo, 1997).

En la directiva 98/48CE del Parlamento Europeo, relativa a la comercialización de biocidas, en el artículo 8 (punto 3) se enumeran los requisitos para la autorización de la comercialización, donde se señala que deben existir datos sobre eficacia. Por tanto, los productos desinfectantes deben pasar controles de valoración de eficacia por los métodos oficiales establecidos (Anónimo, 1998b). La valoración de la eficacia de un desinfectante o antiséptico se realiza en varias fases. En principio, se determina la actividad bactericida del producto con una prueba de suspensión *in vitro*. En la segunda fase, el producto desinfectante es probado dentro de condiciones representativas de las condiciones prácticas y en la tercera fase se realiza una prueba de campo dentro de las condiciones de la industria.

En la actualidad existen un gran número de ensayos de laboratorio para valorar una mínima actividad bactericida de un producto desinfectante. El comité Europeo CEN TC 216 ha desarrollado ensayos de suspensión y superficies para bactericidas y funguicidas, simulando condiciones prácticas de uso, específicamente para alimentos, industrias y mercado doméstico después de estudios en diferentes laboratorios con

varios grupos de investigación (Anónimo, 2001; Anónimo, 1998a; Holah, 1995c). A partir de la conclusión y discusión de estos estudios por los diferentes grupos, se elaboro la norma Europea EN 1276 para los ensayos de suspensión titulada “Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en los productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en la colectividad”, publicada en junio de 1997. En España la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) miembros del Comité Europeo de Normalización (CEN) ha realizado la versión oficial en español publicada en marzo 1998 (Anónimo, 1998a).

La actividad bactericida de un agente antimicrobiano se determina por su capacidad de eliminar un determinado número de microorganismos en un período de tiempo establecido. Pasado este tiempo, un neutralizador adecuado para el desinfectante mas el medio de cultivo es usado para neutralizar el efecto residual que pudiera tener el agente desinfectante sobre las células supervivientes. Sin un neutralizador presente en la prueba el desinfectante puede inhibir el crecimiento de microorganismos viables a lo largo del tiempo (Anónimo, 1998a).

### **3.6. Condiciones para la comprobación de la eficacia del desinfectante**

Existen una serie de factores en los estudios *in vitro* que deben estandarizarse para que las pruebas sean reproducibles y exactas, de modo que sea cual sea el método elegido dependa estrictamente de una buena elección del producto desinfectante y de la normalización de las diferentes operaciones (Collado, 1994). La estandarización siempre es necesaria, ya que debido a los factores biológicos que intervienen en la prueba, y pese a trabajar en condiciones controladas, no puede evitarse una cierta zona de fluctuación en los resultados (Wildbrett, 2000).

En el ámbito de las comprobaciones de la eficacia de los desinfectantes, hay que estandarizar parámetros tales como (Anónimo, 1998a; Collado, 1994):

1.- Cepas microbianas: se suelen emplear cepas representativas de los grandes grupos como: bacilos y cocos Gram positivos y Gram negativos, micobacterias y algunos hongos y levaduras. Se pueden utilizar cepas específicas para estudios en campos determinados donde interese una cepa microbiana particular. Para una buena capacidad comparativa y reproducibilidad en los resultados, es necesario emplear microorganismos en cultivos puros de colecciones reconocidas, como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos) o en España de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). La normativa Española vigente (Anónimo, 1998a), recomienda para los ensayos utilizar *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* y *Salmonella typhimurium* de la ATCC y *Lactobacillus brevis* y *Enterobacter cloacae* de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany).

2.- Preparación del inóculo: la concentración del inóculo debe ser lo suficientemente elevada para que la reducción que obtengamos al realizar el ensayo sea detectable y estadísticamente significativa. Por lo general, esta concentración puede estar en el orden de  $10^9$  UFC/mL en la solución madre. La mayoría de métodos exigen un mínimo de reducción de 5 unidades logarítmicas para considerar el desinfectante como eficaz.

Existen técnicas, como la DGHM (Deutsche Gesellschaft Hygiene Mikrobiologie), donde se inoculan los gérmenes en medio líquidos y el cultivo se emplea como suspensión bacteriana sin ningún tratamiento suplementario. En otras técnicas, como las desarrolladas por la AFNOR (Asociación Francesa de Normalización) y la AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), con la finalidad de obtener un inóculo estandarizado, las siembras se realizan sobre agar triptona con peptona de soja. Tras su incubación el crecimiento bacteriano se emulsiona en un diluyente, ajustando la turbidez con un fotómetro con la finalidad de obtener un inóculo estandarizado para todas las pruebas.

Si se parte de un medio sólido, la suspensión bacteriana parece ser más resistente a la acción de los desinfectantes, pero la resistencia de los gérmenes es poco estable y las bacterias se harán más sensibles después de algunas horas. Este fenómeno no se produce si se parte de cultivo en medio líquido. En este último caso, la reproductividad de los resultados será mayor (Collado, 1994).

3.- Preparación de la solución desinfectante: la preparación difiere según la técnica. En la mayoría de técnicas se diluye el desinfectante en agua destilada estéril, o en agua dura, a la concentración de uso. El desinfectante debe encontrarse a una concentración perfectamente determinada y controlada en referencia al principio activo. Es importante que el desinfectante sea preparado en el momento de la prueba, para prevenir posible pérdida de acción biocida del producto (Collado, 1994). Además, se debe controlar el pH y estandarizar el agua destilada empleada en la solución. Por otro lado, se debe disponer de un agua dura estandarizada, ya que algunos principios activos se ven influidos por materiales inorgánicos como sales presentes en el agua dura (Holah, 1995c).

4.- Condiciones de contacto inóculo-desinfectante: las condiciones pueden ser muy diferentes entre el método portagérmenes y el método de dilución. En el método portagérmenes el inóculo se deposita sobre un portaobjeto y se seca. Seguidamente, el desinfectante se coloca sobre el inóculo ya seco. En este método se debe determinar a través de controles la mortalidad espontáneas de parte del inóculo debido a la desecación (Anónimo, 2001). En el método de dilución, la fase líquida es la que se utiliza para establecer el contacto entre el desinfectante y el microorganismo (Collado, 1994). La forma más sencilla de determinar la acción letal es la comprobación con el ensayo de suspensión sin impurezas (Anónimo, 1997). Es decir, el contacto ideal y completo del principio activo con gérmenes homogéneamente distribuidos en suspensión acuosa, lo cual permite valorar la concentración, la temperatura y el tiempo de actuación mínimos necesarios para reducir la carga del inóculo. El desinfectante se diluye en agua destilada (generalmente) y la suspensión bacteriana se prepara en agua de peptona o caldo buffer, añadiendo en algunas ocasiones materia orgánica para que

interfiera con el desinfectante. Es esencial que los volúmenes del inóculo y de la solución desinfectante sean precisos y que el volumen de la suspensión bacteriana sea relativamente pequeño para que la dilución del desinfectante sea prácticamente nula. (Collado, 1994).

5.- Temperatura: es preciso para cualquier método de estudio de la eficacia de los desinfectantes respetar la temperatura de los reactivos y tiempos de contacto (Holah, 1995b). En la mayoría de los productos desinfectantes, el incremento de la temperatura aumenta su eficacia hasta alcanzar un punto máximo de actividad desinfectante, punto a partir del cual el incremento de la temperatura produce una pérdida de potencia biocida (Gerald y Gilbert, 1998). Para la mayoría de los productos desinfectantes, un incremento de 10 °C supone un incremento del doble de su capacidad bactericida (Herruzo, 2000), por lo que es de suma importancia su control en los métodos de evaluación. La temperatura que se suele utilizar en la mayoría de métodos de control de productos destinados a la desinfección es de 20 °C.

6.- Concentración de desinfectante y tiempo de contacto: la actividad del desinfectante es proporcional a la concentración y al tiempo de contacto. Existe una relación inversa entre estos parámetros, si aumentamos el tiempo se puede disminuir la concentración y viceversa. La mayoría de métodos utilizan en los ensayos de suspensión de 5 a 10 minutos, pudiendo ser superiores a concentraciones bajas (Holah, 1995b).

7.- Eliminación del efecto inhibitorio residual del desinfectante: es un paso fundamental en las técnicas de valoración de eficacia de los desinfectantes y difícil a la hora de ajustar una metodología. Técnicamente existen tres procedimientos: dilución, neutralización y lavado.

La dilución, normalmente, no es suficiente para eliminar el efecto residual antimicrobiano del desinfectante. Algunos desinfectantes, tales como amonios cuaternarios y sales de metales pesados, pueden tener actividad bacteriostática incluso sometida a una alta dilución del producto.

La neutralización es un fenómeno complejo, consiste de una neutralización química la cual se puede dar mediante una reacción química o mediante una

interacción química con el neutralizante. La elección del neutralizante es uno de los elementos menos estandarizados, por qué se deja la elección del mismo al investigador para cada desinfectante en particular. Es uno de los elementos que tiene que ajustar el investigador de cara a desarrollar los ensayos de eficacia para un producto desinfectante elegido.

El lavado implica una separación mecánica entre las células bacterianas y el desinfectante. Se puede realizar por centrifugación o por filtración sobre membrana.

En las pruebas se suelen utilizar conjuntamente dos o tres de estos procedimientos para eliminar el efecto inhibitorio del desinfectante, por ejemplo: la dilución y la neutralización. Las normas estándar Europeas recomiendan la dilución-neutralización, dejando la filtración sobre membrana como ultima alternativa en el caso que no se obtuviese ningún neutralizador adecuado para el desinfectante a evaluar (Anónimo, 2001; Anónimo 1998a; Anónimo, 1998b; Anónimo, 1997).

8.- Determinación de gérmenes supervivientes: se realiza por medio de la toma de una alícuota del ensayo a la que se añade un medio de cultivo para realizar el posterior contaje. Los medios de cultivo pueden ser coayudantes en el proceso de inhibición o neutralización del principio activo del desinfectante, con lo cual, al tener lugar el contacto con el medio, existe una interrupción de la actividad bacteriostática remanente si es que la hubiere. Posteriormente se realiza, mediante protocolo convencional, un recuento de gérmenes supervivientes, con el fin de calcular la reducción bacteriana ejercida por el desinfectante.

### **3.7. Valoración de la eficacia de los desinfectantes en superficies**

En los países de la Unión Europea se recomienda evaluar a los desinfectantes en tres fases: En la fase uno se estudia la actividad básica del producto desinfectante con una prueba de suspensión (Anónimo, 1997). Seguidamente se evalúa el nivel de eficacia del producto desinfectante simulando las condiciones prácticas de uso (Anónimo, 1998a), y para concluir en la fase final se recomienda una evaluación de

campo dentro de las condiciones reales de aplicación del producto en la industria alimentaria (Anónimo, 2001). Para los desinfectantes destinados a desinfección de superficies la estructura del método es muy similar; los gérmenes que se estudian se inoculan sobre un soporte y se dejan secar, posteriormente se le aplica el producto desinfectante y se les deja un tiempo de contacto que por lo general son 5 minutos para bacterias y 15 minutos para hongos. Trascurrido el tiempo de contacto finalmente se determina el número de microorganismos supervivientes en las superficies (Collado, 1994).

En estos últimos años, se han establecido numerosas pruebas en los diferentes países tanto para poder valorar la efectividad teórica como real de los desinfectantes, pero por lo general, estos son complejos y costosos para la realización en forma rutinaria (Collado, 1994). Para ello, deberemos pensar en controles prácticos que si bien no son tan exactos, nos pueden dar una idea de la efectividad o no del producto en las condiciones particulares de utilización en cada centro o planta. Además, con la ventaja de que estas técnicas, que por ser simples se pueden aplicar en forma rutinaria con un personal no muy especializado, no implicando un coste elevado.

Las técnicas de estudio bacteriológico de superficies se pueden dividir en dos grandes grupos: de superficies como tal y de ambiente. Dentro de las técnicas de superficie, podemos encontrar la impronta sobre medio de cultivo sólido y el uso de escobillones estériles. Para los controles de ambiente se suelen utilizar placas de petri y aerobio-colectores, que deben ser complementarios a los controles de superficie (Orihuel-Iranzo, y col., 1998). Los métodos de superficies reflejan la contaminación después de desinfectada una zona. Es aconsejable realizar dos muestreos, uno antes y otro después del proceso de limpieza y desinfección, para conocer realmente la efectividad del producto, sin olvidar que las operaciones de desinfección no cumplen la ley del todo o nada, si no que deben reducir un número de microorganismos determinado. En algunos casos muy particulares puede interesar producir una reducción de los microorganismos en las superficies hasta alcanzar una esterilización comercial o casi una esterilización. Para estos casos se deben implementar



evaluaciones particulares de acuerdo al caso que pueden ir más allá de las simples evaluaciones de superficies pudiendo utilizarse métodos más modernos como la determinación de ATP y métodos más precisos que impliquen técnicas más complejas que combinen recolección de muestras y determinaciones específicas en el laboratorio para cada caso en particular.

#### **4. TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS FLUIDOS**

##### **4.1. Tratamientos térmicos**

De los métodos físicos, los tratamientos térmicos son en la mayoría de los casos los tratamientos escogidos para la conservación de la leche, los zumos y otros alimentos perecederos (Tabla 1). El procesamiento térmico tiene una larga tradición al ser un método económico y eficiente en el logro de la inactivación microbiana (Diels y col., 2005; Diels y col., 2003; Vachon y col., 2002). Cuando el tratamiento térmico es eficiente, y dependiendo del nivel de temperatura, puede destruir las formas vegetativas de las bacterias e intenta la inactivación de esporas bacterianas, especialmente de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Pero en algunos casos, la higienización por calor tiene sus aplicaciones limitadas sobre todo en alimentos que contengan gran cantidad de proteínas y azúcares susceptibles a la desnaturalización por procesos térmicos, ya que, las altas temperaturas pueden inducir efectos indeseables tales como cambios en el sabor, pardeamiento no enzimático y desnaturalización de ciertas vitaminas y proteínas (Vachon y col., 2002).

El calor en la leche también puede inducir otros cambios como la reducción del calcio soluble, la formación de complejos entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\kappa$ -caseína (Jonson y col., 1990), además de la reducción del rendimiento quesero. Por otra parte la descomposición térmica de la  $\beta$ -lactoglobulina produce compuestos sulfúricos volátiles que pueden inhibir la fermentación láctica, que afectan la apariencia, el gusto

y el valor nutricional de la leche, así como su comportamiento durante el procesado para la obtención de subproductos tales como el queso y el yogurt.

**Tabla 1.** Tratamientos térmicos más utilizados por la industria para la conservación de leche, zumos y otros alimentos fluidos perecederos

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo
Termización	63-65	15-30 seg
Pasteurización		
<sup>a</sup> HTST	72-75	15-20 seg
<sup>b</sup> LTLT	63-65	30 min
Ultra Pasteurización	125-138	2-4 seg
Esterilización		
En envase	115-120	20-30 min
<sup>c</sup> UHT	138-150	1-4 seg

<sup>a</sup> High Temperature Short Time

<sup>b</sup> Low temperature Long Time

<sup>c</sup> Ultra High Temperature (directo e indirecto)

Dentro de estas técnicas que utilizan calor se incluye la termización, la cual se aplica, por lo general, previa a los procesos de pasteurización con el fin de reducir la carga microbiana y favorecer la germinación de los microorganismos esporulados, lo que facilita la eliminación de las formas vegetativas durante el proceso de pasteurización. Uno de los inconvenientes del proceso de terminación es el posible desarrollo de microorganismos que crecen en el producto al resistir las temperaturas aplicadas (63-65 °C por 15- 30 Seg) y luego encuentran muy poca competencia por parte de otros microorganismos en el medio, lo que favorece su rápida multiplicación.

La pasteurización tiene como objetivo inactivar las bacterias patógenas en la leche cruda, los derivados lácteos y otros productos fluidos. En la leche, este tratamiento debe asegurar la destrucción de *Mycobacterium tuberculosis* sin afectar de forma importante sus propiedades físicas y químicas. Actualmente, en la industria se utilizan dos grupos de tratamientos de pasteurización, los de alta y baja temperatura. Los tratamientos de baja temperatura (63-65 °C) se caracterizan por la aplicación de temperaturas y tiempos capaces de inactivar la fosfatasa alcalina, mientras que los de alta (125-138 °C), además de inactivar esta enzima, pueden inactivar también la peroxidasa (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004).

Otro tratamiento habitual aplicado a la leche y a otros productos alimenticios fluidos es la esterilización, en el cual se pueden aplicar temperaturas de hasta de 150 °C con el fin de eliminar la microbiota banal y patógena presente en el producto, en pro de prolongar su tiempo de conservación. La esterilización se puede aplicar al producto antes o después de envasado. Antes del envasado el tratamiento se aplica directamente sobre el producto (UHT) utilizando temperaturas de entre 138-150 °C, durante periodos muy cortos de 1-4 seg, seguido posteriormente de un envasado aséptico que garantiza la esterilidad del producto y su conservación prolongada. En la esterilización en el envase, tras un precalentamiento de 80 °C, el producto es envasado y llevado a autoclaves discontinuos donde se alcanzan temperaturas de 115-120 °C durante 20-30 minutos (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004).

#### **4.2. Tratamientos no térmicos**

La tendencia actual en todos los países es la demanda de productos naturales lo mas semejante posible desde el punto de vista organoléptico y nutritivo, a los productos frescos. Para ello es necesario que estos no hayan sufrido un proceso de transformación severo y que, a su vez, sean seguros y que posean una larga vida útil (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004). Esta preferencia por los alimentos más fresco de alta calidad, ha generado en los últimos 15 años un interés creciente, y ha

provocado que se realicen considerables esfuerzos de investigación para el desarrollo de nuevos procesos no térmicos requeridos para la conservación de alimentos, tales como el uso de la alta presión hidrostática, los campos eléctricos pulsantes, los pulsos luminosos, las radiaciones ionizantes, y más recientemente, la ultra-alta presión de homogeneización (UHPH) (Diels y col., 2004; Diels y col., 2003; Gervilla y col., 2000; Gervilla y col., 1997a). La búsqueda de estos tratamientos alternativos a los tratamientos térmicos ha sido impulsada por el conocimiento que en la actualidad se tiene de la pérdida de valor nutritivo y características organolépticas que sufren los alimentos al ser sometidos a este tipo de tratamientos. Por otra parte, el aumento de la demanda de los consumidores de productos de alta calidad, con características organolépticas y nutritivas semejantes a los productos frescos o naturales, y además que representen el mínimo riesgo sanitario, ha contribuido en estos últimos años al desarrollo y a la investigación de todas estas nuevas tecnologías (McDonald y col., 2000; Splittstoesser y col., 1996). Dentro de las nuevas tecnologías disponibles para el procesamiento de alimentos, los tratamientos por alta presión son considerados como la tecnología emergente más prometedora para su aplicación en alimentos, debido a las mejoras recientes en los equipos, que permiten tratar a los alimentos a presiones mayores, y que ha permitido la introducción en el mercado de alimentos procesados por esta tecnología (Kheadr y col., 2002; Lucore y col., 2000).

#### **4.2.1. Irradiación de alimentos**

Es un método físico de conservación, que consiste en aplicar radiaciones ionizantes a los alimentos de una forma controlada por un tiempo determinado para reducir su carga microbiana. El límite máximo de radiación al que puede ser sometido un alimento, según la legislación Europea es de 10 KiloGrays (KGy). Los tratamientos de irradiación son efectivos contra numerosos patógenos de alimentos como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., *Staphylococcus aureus* y otras bacterias a dosis entre 1,5 y 10 KGy (Fernández-Ginés y col., 2002). La

irradiación es considerada un tratamiento complementario a otros métodos de higienización, para incrementar la vida útil de muchos alimentos. Ha generado gran atención debido a su potencial para generar alimentos seguros, aunque ha tenido también muchos otros usos, tales como la desinfectación de productos hortícolas, la extensión de la vida post-cosecha de producto fresco, la inhibición de brotes en el ajo, la cebolla y las papas (Gunes y Tekin, 2006; Fernández-Ginés y col., 2002). En dosis bajas se ha utilizado para demorar la maduración y la senescencia de frutas y vegetales, y para controlar insectos y parásitos en los alimentos. Por otra parte, puede tener otras aplicaciones en dosis altas, como la esterilización de carne, pollo, marisco y pescado, en combinación con tratamientos térmicos suaves para inactivar las enzimas (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004; Fernández-Ginés y col., 2002).

Actualmente, aunque esta tecnología parece segura y ha sido aprobada por numerosas autoridades en todo el mundo (FDA, USDA, FAO, etc), tiene poca aceptación por los consumidores al estar asociado a la palabra nuclear. Esto es probablemente debido al temor, erróneo, por parte de los consumidores al percibir que los alimentos irradiados pueden ser radioactivos y que la irradiación podría producir efectos perjudiciales en el alimento y en ellos mismos (Fernández-Ginés y col., 2002; Bolder, 1997). Además, la información negativa difundida por los adversarios de la irradiación ha podido afectar también la aceptación del consumidor de alimentos irradiados.

#### **4.2.2. Campos eléctricos pulsantes**

Consiste de la aplicación de campos eléctricos pulsantes muy cortos de alta intensidad (5-70 Kv), a temperaturas moderadas (Bendicho y col., 2002). Los campos eléctricos tienen una duración de 1-10  $\mu$ s y una intensidad de 30 Kilovoltios (Kv), y pueden ser usados para tratar alimentos, aunque los tratamientos pueden cambiar de según la naturaleza del producto (Dunn, 1996). El producto más comúnmente usado para probar la efectividad de los campos eléctricos pulsantes, como método de

higienización, ha sido la leche y otros productos lácteos. Las investigaciones han sido focalizadas en estudiar los efectos sobre los microorganismos y las enzimas y su efectividad ha sido demostrada. Los pulsos pueden ser aplicados en alimentos a temperaturas inferiores a las temperaturas de pasteurización y puede eliminar la contaminación microbiana sin afectar significativamente la calidad organoléptica del producto (Bendicho y col., 2002; McDonald y col., 2000). Esta tecnología puede producir ligeros incrementos de la temperatura, que dependen de la intensidad del tratamiento, dando origen a la formación de radicales libre y de la permeabilidad de las membranas celulares, que son la principal causa de la destrucción microbiana. Factores fisiológicos propios del microorganismo, tales como la fase de crecimiento, la especie, y el tamaño del inóculo, así como parámetros relacionados con el producto, como la conductividad del medio, el pH, la temperatura y la presencia de partículas pueden modificar el efecto de los campos eléctricos en la microbiota (Bendicho y col., 2002; McDonald y col., 2000; Barsotti y Cheftel, 1999). Los estudios han revelado que esta técnica produce muy pocos cambios en la composición del alimento en comparación con los tratamientos térmicos, obteniendo productos con excelente calidad nutricional y sensorial, manteniendo siempre la frescura del alimento original (Bendicho y col., 2002).

#### **4.2.3. Pulsos luminosos**

Es una tecnología que consiste en aplicar muy brevemente pulsos luminosos (25 % UV, 45 % visible y 30 % infrarrojo) de intensidades muy altas y de longitudes de onda entre 200 y 1100 nm, en la superficie de los alimentos. La aplicación de pulsos luminosos permite inactivar o inhibir los diferentes mecanismos de alteración de los alimentos, así como descontaminar líquidos de poca opacidad, y la superficie de alimentos sólidos (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004). Los efectos primarios del tratamiento, y el principal mecanismo bactericida, están relacionados con la riqueza

del espectro de la luz UV utilizado, con su intensidad y con la duración del tratamiento.

En esta tecnología, solo se requieren unos pocos destellos de luz para causar una reducción bacteriana considerable, prolongando la vida comercial del producto, generando un nivel muy bajo de alteración de las características organolépticas y nutritivas del alimento. El proceso es muy rápido, sencillo y de alto rendimiento. La luz no es ionizante y no es capaz de penetrar materiales opacos, pero puede transmitirse a través de algunos materiales de empaque y, además, puede utilizarse para tratar productos ya empacados, obteniendo un buen nivel de inactivación en la superficie de los empaques y de los alimentos. Debido a que la luz se trasmite fácilmente a través del aire o del agua, esta tecnología permite alcanzar un alto nivel de inactivación microbiana en estos medios. En los alimentos, debido a lo opaco e irregular de su superficie, se producen bajos niveles de inactivación microbiana. Sin embargo, se puede lograr extender su vida útil y reducir el riesgo de la presencia microorganismos patógenos (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004; Dunn, 1996).

#### **4.2.4. Altas presiones hidrostáticas**

La alta presión hidrostática (HHP) es la tecnología en la cual un producto se somete a presión igual o superior a 100 MPa. La presión se trasmite de forma uniforme (isostática), y de forma casi instantánea a todos los puntos del alimento, independientemente de su tamaño y forma. Esto permite obtener productos muy homogéneos, sin zonas sobretratadas. Además, una vez que se alcanza el valor de presión deseado, no hay pérdidas de energía ni, consecuentemente, requerimientos energéticos adicionales (Yuste y col., 2005; Huppertz y col., 2002). Los fenómenos de presurización por HHP están regidos por dos principios fundamentales: el primero, que corresponde al principio de la isostática, establece que los cambios de presión son prácticamente instantáneos y uniformes, independientemente del volumen y la geometría de la muestra; el segundo, el principio de Le Chatelier, el cual postula que

todo fenómeno que va acompañado de una disminución de volumen se ve favorecido por la presión, y viceversa (Huppertz y col., 2002; Mozhaev y col., 1994).

Aunque los primeros trabajos en la aplicación de HHP fueron llevados a cabo a finales del siglo diecinueve (Hite, 1899), el interés por procesar los alimentos por HHP no se desarrolló hasta después de 1970, principalmente debido a una falta de equipos adecuados antes de este tiempo, y a un aumento considerable de estos en los últimos años. En 1990 se introdujo en el mercado japonés el primer alimento procesado por HHP, que consistía de una mermelada de fruta. Recientemente, otros productos procesados por HHP han sido lanzados al mercado, entre los que se incluyen ostras en los Estados Unidos, zumo de naranja en Francia y salsa guacamole en México (Huppertz y col., 2002). La presión y la temperatura determinan muchas propiedades de las sustancias inorgánicas y orgánicas. Sin embargo, si una sustancia es expuesta a una presión creciente, pueden producirse cambios en la sustancia, especialmente a presiones de varios cientos de MPa, como puede ocurrir con el incremento de la temperatura en los procesos térmicos. En general, cambios asociados con la reducción del volumen pueden ocurrir durante la aplicación de HHP (Huppertz y col., 2002).

La inactivación microbiana causada por la HHP se debe a una desnaturalización de enzimas y, sobretudo, a la modificación de la membrana y la pared celular. Los tratamientos también pueden provocar cambios en la morfología y los mecanismos genéticos de los microorganismos (De lamo-Castellví y col., 2005a; Yuste y col., 2005). En general, cuanto más complejo es el organismo, mayor sensibilidad muestra a los tratamientos por presión. Así, los parásitos, los mohos y las levaduras son muy sensibles, mientras que los virus suelen presentar una alta resistencia. Las cepas de colección se inactivan, por lo general, más fácilmente que las que proceden de un alimento. Las células vegetativas son más sensibles que las esporas, las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas y los cocos, a su vez, son más resistentes que los bacilos. Todas las células en fase de crecimiento exponencial son más barosensibles que las células en cualquier otra fase de crecimiento (De lamo-



Castellví y col., 2005a; Lopez-Pedemonte y col., 2003; Gervilla y col., 1999a; Patterson y Kilpatrick, 1998).

El tipo de transmisión y la eficacia energética son algunas de las ventajas de esta tecnología si se compara con los tratamientos convencionales por calor. El tratamiento por presión puede realizarse a temperaturas considerablemente más bajas que los tratamientos por calor, incluso a temperaturas de refrigeración y congelación (Yuste y col., 2005). La mayor ventaja de esta tecnología en el procesamiento y preservación de alimentos es la eliminación o significativa reducción del proceso de calentamiento, con lo que se evita la degradación térmica de los componentes del alimento, por lo que se produce una alta retención del sabor, del color y del valor nutricional del alimento tratado. La uniformidad del tratamiento durante la aplicación de la HHP reduce apreciablemente la necesidad de utilización de aditivos químicos, e incrementa la potencialidad para la creación de nuevos productos debido a la generación de nuevas texturas, sabores y propiedades funcionales (Huppertz y col., 2002) (Tabla 2).

La HHP no presenta una mayor expansión debido a limitaciones que impiden su aplicación a nivel industrial a gran escala. Por ser una tecnología relativamente nueva, existe un desarrollo limitado de los equipos, lo que los hace sumamente costosos, además de tener una aplicación limitada según el tipo de alimento y de la incapacidad de ser utilizados como procesos continuos a nivel industrial (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004).

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de la alta presión hidrostática

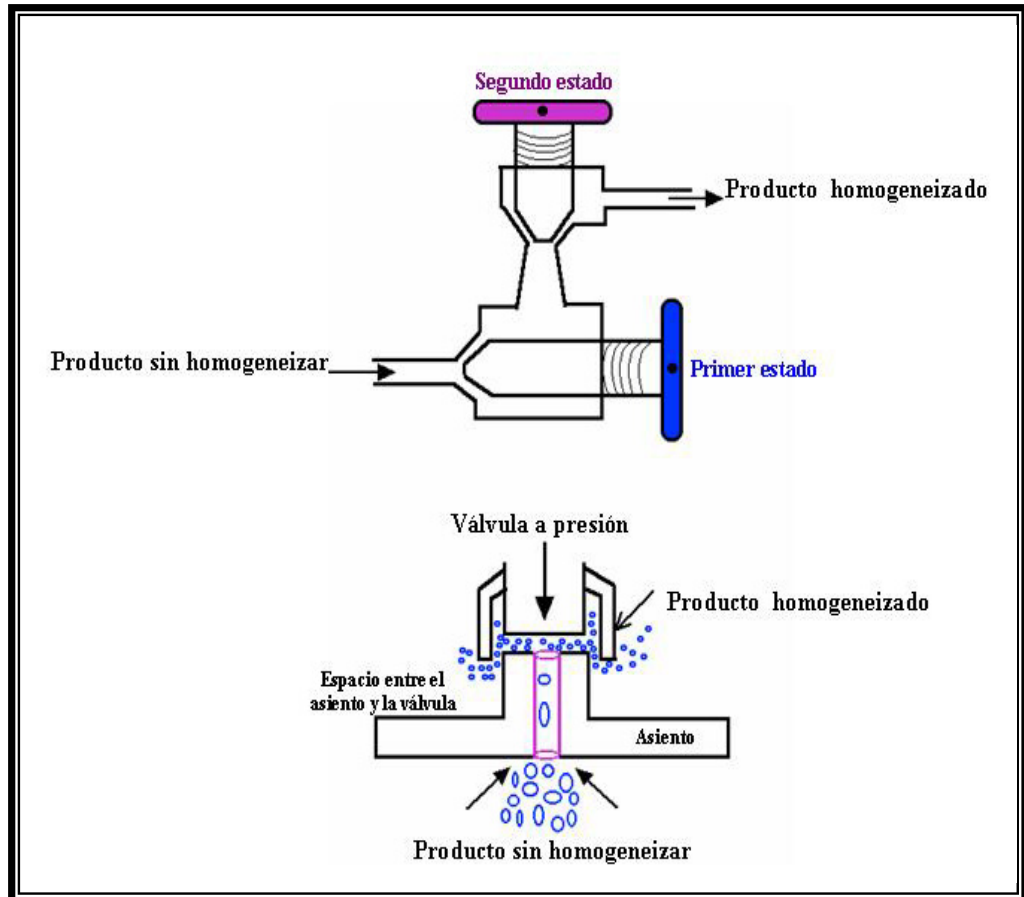
Ventajas	Desventajas
Evita la deformación de los alimentos	Alto coste de los equipos
No deteriora nutrientes termolábiles	No se pueden realizar los procesos en continuo
No produce pardeamiento no enzimático	Aplicación limitada según el tipo de alimento
No precisa de la adición de aditivos	Desconfianza del consumidor
Genera poco gasto energético	Generación de daños subletales

La mayor desventaja de la HHP es que causa, en algunos casos, daños subletales en los microorganismos, los cuales pueden recuperarse transcurrido un cierto tiempo en alimentos que contengan gran cantidad de nutrientes y un pH cercano a la neutralidad (De Iamò-Castellví y col., 2005a; De Iamò-Castellví y col., 2005b). Diversos estudios han descrito extensamente la capacidad de la HHP de causar acumulación de daños subletales en diferentes microorganismos, empleando diferentes matrices, que pueden llevar a una recuperación subsiguiente y creciente de las células bacterianas dependiendo de las condiciones de almacenamiento posteriores al tratamiento (De Iamò-Castellví y col., 2005a; De Iamò-Castellví y col., 2005b; Patterson y Kilpatrick, 1998; Patterson y col., 1995). En estudios conducidos por Wuytack y col. (2003), donde se compararon cinco tipos diferentes de tratamientos de higienización, los investigadores informaron que los niveles de daños subletales encontrados fueron mayores en la HHP y los tratamientos térmicos en comparación con los pulsos luminosos, los campos eléctricos pulsantes y la ultra alta presión de homogeneización (UHPH), que mostró el nivel más bajo de lesionados. Este es el punto que diferencia claramente la HHP de la otra tecnología de alta presión de aplicación más reciente la UHPH.

## **5. ULTRA ALTA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN**

En los últimos años, la industria alimentaria se ha dedicado a investigar y desarrollar una gran variedad de nuevos productos alimenticios de una alta calidad nutricional y sensorial además de ser seguros para su consumo. Esta tendencia hace que a diario sean puestos en el mercado alimentos novedosos que cumplan con estas características y que además sean naturales o minimamente procesados sin que signifiquen un peligro potencial para el consumidor. Estas nuevas tendencias del mercado han hecho que en la industria se desarrollen métodos alternativos para la higienización de alimentos buscando siempre afectar lo menos posible sus características naturales tales como su apariencia, el sabor y el olor; es así, que tecnologías como la HHP estén alcanzando un buen auge en los últimos 10 años, aunque tienen la limitación de que solo permite tratar volúmenes reducidos de alimentos. Esto ha obligado a pensar, y diseñar, procedimientos que permitan tratar grandes volúmenes de productos. Es así que se ha comenzado a desarrollar una nueva tecnología como es la UHPH, que constituye una alternativa que permite tratar mayores volúmenes de alimentos líquidos, tales como leche y zumos, aplicando presiones de hasta 400 MPa en forma continua e incluso permitiendo repetir el tratamiento en forma de ciclos hasta alcanzar un nivel de higienización adecuado.

La alternativa más reciente a los tratamientos térmicos es la aplicación de UHPH, también conocida en la literatura como alta presión dinámica. La UHPH es una tecnología muy novedosa, basada en los mismos principios de diseño que la homogeneización convencional (figura 1), utilizada desde hace muchos años en la industria láctea para reducir el tamaño del glóbulo graso (1 a 10  $\mu\text{m}$ ), con el fin de incrementar la estabilidad de la emulsión y evitar el desnatado y la coalescencia durante el posterior periodo de almacenamiento de la leche y de otros productos lácteos (Hayes y Kelly, 2003a; Hayes y Kelly, 2003b; Thiebaud y col., 2003; Vachon, y col., 2002; Paquin, 1999).



**Figura 1:** Esquema de una válvula en un sistema de homogeneización convencional.

En el proceso de homogeneización convencional, la leche es forzada a pasar, usando una bomba, a través de espacios muy reducidos de una válvula ajustable a una temperatura de entre 45-50 °C y presiones menores de 50 MPa. Esto causa un incremento de la velocidad del fluido y una posterior pérdida de la presión a su paso por la válvula que provoca cavitación, efectos de roce, turbulencias y coalescencia en la superficie, efectos que al combinarse reducen el tamaño del glóbulo graso de la leche (figura 1). La rápida depresión del fluido produce también un cambio de la temperatura, favoreciendo la formación de burbujas de gas (o cavidades) en el interior,

y que forman un núcleo que crece y causan la ruptura del glóbulo graso (Hayes y col., 2005; Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002; Guerzoni y col., 1999).

En la actualidad, moderadas presiones de homogeneización (20 a 50 MPa) se utilizan en las industrias de alimentarias, farmacéutica y cosméticas para dispersar fases no micelares, estabilizar emulsiones y/o preparar productos con unas apropiadas propiedades reológicas (Diels y col., 2005; Hayes y col., 2005; Flourey y col., 2004a; Hayes y Kelly, 2003a; Paquin, 1999). Sin embargo, las UHPH trabaja a presiones significativamente mayores ( $> 200$  MPa), lo que implica también la destrucción de grandes cantidades de microorganismos que puedan estar presentes en el alimento. Consecuentemente, parece ser un importante método para reducir la carga microbiana inicial en un alimento, pero minimizando los daños en el producto provocados por el calor (Popper y Knorr, 1990).

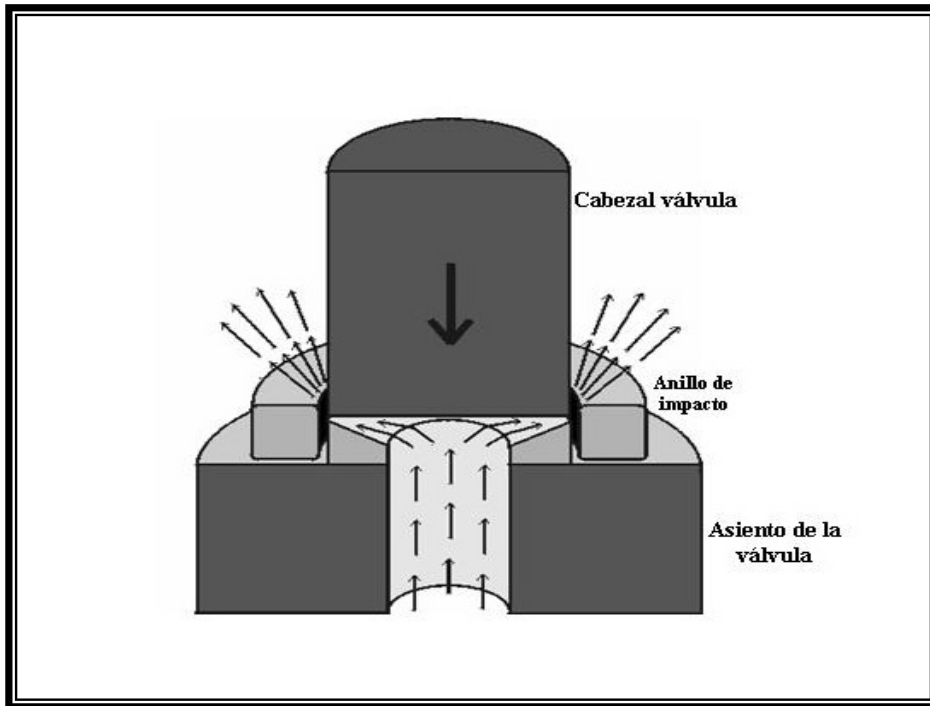
Básicamente, un homogeneizador de UHPH consiste de un generador de alta presión, ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones muy altas. En cualquier tipo de válvula de homogeneización el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula, que es el espacio comprendido entre el cabezal y el asiento de la válvula, el cual puede ser regulado a través de la fuerza que se aplique al cabezal, para reducir el espacio entre este y el asiento de la válvula, lo que incrementaría el nivel de presión de tratamiento (Flourey y col., 2004b).

### **5.1. Tipos de homogeneizadores de alta presión**

Varios tipos de homogeneizadores de alta presión están disponibles para su uso en las industrias alimentarias, farmacéuticas y químicas. Uno de los más utilizado es el APV-Gaulin, el cual solo puede alcanzar presiones máximas de 130 MPa. Pero este equipo tiene la capacidad de procesar grandes volúmenes de muestra (hasta 10.000 L/h), dependiendo del ajuste del espacio de la válvula de acuerdo al nivel de presión (Figura 2) (Flourey y col., 2004b). El fluido en este tipo de homogeneizador es

bombeado a través del asiento contra el cabezal de la válvula, produciéndose un choque contra este y el anillo de impacto, lo que genera cavitación, efecto de roce, turbulencias y coalescencia en la superficie del fluido, que combinados pueden causar la ruptura de las células microbianas (Floury y col., 2004b).

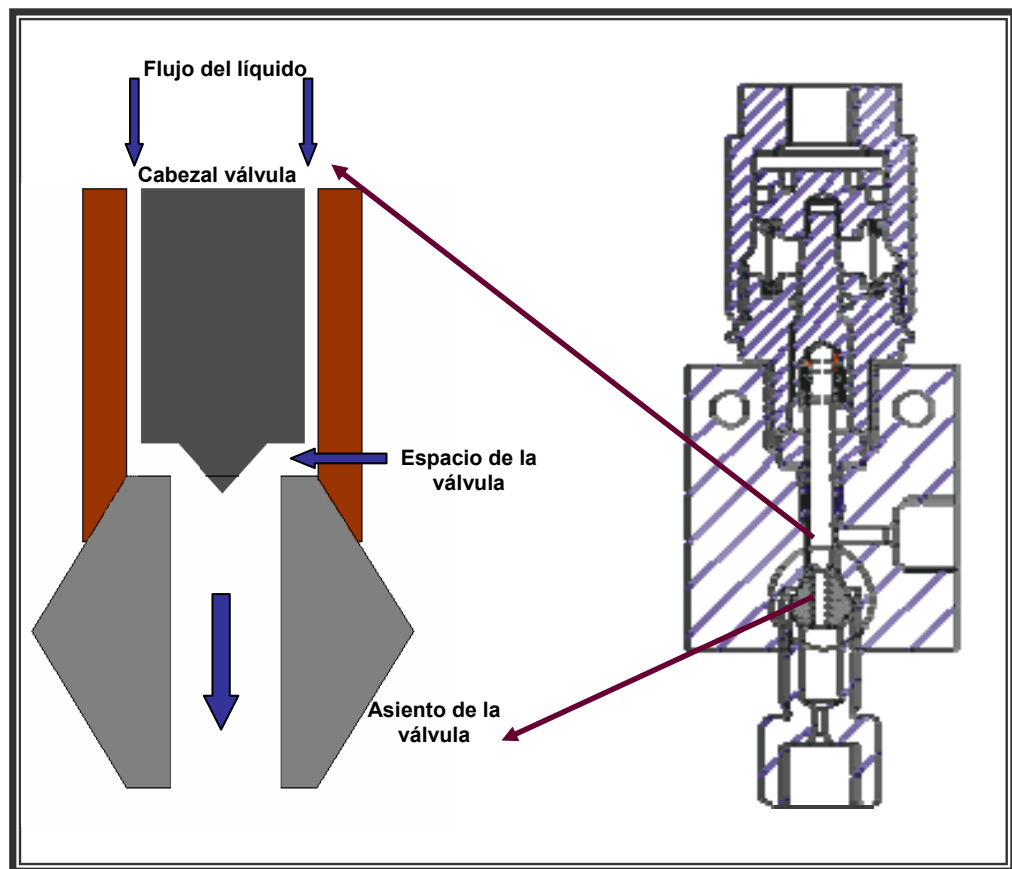
Existen homogeneizadores de menor capacidad de procesado, pero capaces de alcanzar presiones muy superiores (hasta 400 MPa), e incluso con un doble sistema de válvulas dentro de los cuales se incluyen los homogeneizadores *Stansted*. La válvula de homogeneización de tecnología *Stansted* esta fabricada con un material cerámico capaz de soportar niveles de UHPH de hasta 400 MPa. Además, la geometría de la válvula ha sido modificada radicalmente, si se compara con un homogeneizador clásico de alta presión del tipo de APV-Guilin. La primera diferencia importante radica en que la dirección del flujo, a través de la válvula, es en reverso (Figura 3). En la válvula de diseño clásico el líquido es alimentado axialmente en el asiento de la válvula y entonces el líquido acelera radialmente en una pequeña región entre el cabezal y el asiento de la válvula. Una vez que el fluido sale del espacio de la válvula, llega a ser un chorro radial que se estanca en el anillo de impacto antes de salir del homogeneizador a presión atmosférica (Floury y col., 2004a; Floury y col., 2004b) (Figura 2).



**Figura 2:** Sección transversal de la válvula de un homogeneizador *APV-Gaulin*. Flujo de la materia presurizada, cabezal y asiento de la válvula

En la válvula *Stansted*, por el contrario, el líquido es primero alimentado axialmente a lo largo de la parte móvil de la válvula, y entonces acelera radialmente por el espacio estrecho entre el cabezal y el asiento de la válvula. Simulaciones numéricas revelan que ese chorro radial sale del asiento de la válvula sin chocar en el punto de válvula, pero éste se recircula, en gran parte, apenas sale de la abertura, antes de fluir fuera del asiento de válvula (Floury y col., 2004a; Floury et. al., 2004b). La presión del líquido que se alcanza en la válvula es lo que se denomina “presión de homogeneización”. El tamaño de la abertura entre el asiento y el cabezal, y la velocidad resultante de la corriente y la presión del líquido antes de alcanzar la válvula, dependen de la fuerza con que se aplique el cabezal contra el asiento de la válvula, el cual puede ser ajustado para regular la intensidad o presión de la

homogeneización. Aunque la configuración de la válvula *Stansted* parece ser simple, la dinámica en la cual está envuelto el fluido a su paso a través de la válvula es bastante compleja. Intensos cambios de energía ocurren en la válvula de homogeneización cuando el líquido en su paso a través de válvula cambia de alta presión y baja velocidad antes de pasar entre el asiento y el cabezal (espacio de la válvula), a baja presión y alta velocidad después de salir del espacio de la válvula y fluir a través del asiento en su camino hacia la salida del homogeneizador de UHPH (Floury y col., 2004a).



**Figura 3:** Sección transversal de la válvula de un homogeneizador *Stansted* model/DRG FPG7400H:350. Flujo de la materia presurizada, cabezal y asiento de la válvula.



## **5.2. Aplicaciones en el procesado de los alimentos**

En la actualidad, el número de trabajos disponibles referentes a la inactivación de microorganismos y a los efectos sobre los componentes y las propiedades de los alimentos, como consecuencia de la aplicación de UHPH es limitado, sobre todo por ser esta una tecnología novedosa. Ha habido recientes avances en la última década en el diseño de nuevos equipos de UHPH, con doble sistema de válvula, capaces de alcanzar presiones de hasta 400 MPa, con un volumen máximo de 120 L h<sup>-1</sup>. Estos equipos que hasta hace muy pocos años no estaban disponibles, y aun hoy en día equipos capaces de alcanzar estos niveles de presión y volúmenes se encuentran en fase experimental. La UHPH ha sido utilizada previamente por la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética aplicando presiones de homogeneización moderadas (20 a 50 MPa) para dispersar fases no micelares, estabilizar emulsiones y/o preparar productos con adecuadas propiedades reológicas (Diels y col., 2005; Hayes y col., 2005; Hayes y Kelly, 2003a; Hayes y Kelly, 2003b; Paquin, 1999). Además desde hace algunos años, presiones inferiores a 100 MPa han sido utilizadas para producir emulsiones de gotas muy finas (0,3-0,4 µm), y para recuperar proteínas y otros componentes de las células microbianas (Thiebaud y col., 2003; Popper y Knorr, 1990). La UHPH a presiones superiores de 200 MPa y temperaturas de entrada entre 40 y 50 °C, puede inducir una significativa inactivación microbiana y enzimática, además de modificar las propiedades reológicas y/o de coagulación de la leche y de los productos lácteos (Thiebaud y col., 2003).

Con la fabricación de nuevos equipos con materiales más resistentes capaces de alcanzar presiones más altas, una de las grandes aplicaciones futuras de esta tecnología es la destrucción de microorganismos por desintegración celular, lo que podría ser un importante medio para lograr disminuir la carga microbiana de los alimentos, reduciendo a su vez los daños causados en las propiedades de los mismos (Popper y Knorr, 1990).

### 5.3. Efecto sobre la preparación de emulsiones

Se ha estudiado la capacidad de la UHPH para producir emulsiones de gotas muy pequeñas y microparticulación, empleando para ello emulsiones preparadas a base de aceites vegetales, metilcelulosa y proteínas del suero tratadas a diferentes niveles de presión (Floury y col., 2003; Desrumaux y Marcand, 2002; Floury y col., 2000). Los resultados encontrados en estos estudios no suelen ser del todo claros, ya que en la mayoría utilizan presiones menores a 200 MPa y no son capaces de explicar claramente el efecto del nivel de presurización. Cuando se ha utilizado la metilcelulosa como estabilizante y emulsificante, se ha observado modificaciones significativas en la estructura y textura de las emulsiones con el incremento del nivel de presión en el proceso de homogeneización. El tamaño de las gotas en las emulsiones preparadas puede variar entre 0,40 y 6,45  $\mu\text{m}$  en función de la cantidad de aceite de girasol, metilcelulosa adicionada y el nivel de presión. Se ha observado que las gotas son de mayor tamaño con a un mayor nivel de presión, un porcentaje mas alto de aceite y una proporción menor de metilcelulosa. Aparentemente, la mayor proporción de aceite y la poca cantidad de metilcelulosa disponible en el medio pueden favorecer la coalescencia de las gotas de aceite, que pueden formar gotas de mayor tamaño. El nivel de presión no afecta la consistencia de este tipo de emulsiones, que depende más de la cantidad de metilcelulosa adicionada y de la proporción de aceite, que de la UHPH aplicada durante el proceso (Floury y col., 2003).

Por otra parte, en preparaciones conteniendo 1,5 % de proteínas de suero lácteo y 10 % de aceite de girasol presurizadas a 150 MPa, se han obtenido emulsiones aceite en agua con un tamaño de gota entre 0,3 y 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, y aplicando un segundo ciclo de 150 MPa se puede reducir aun más la dispersión del tamaño de la gota. En contraste, emulsiones preparadas usando presiones de 300 MPa contienen una proporción significativamente mayor de gotas de un diámetro superior a 5,0  $\mu\text{m}$ . Los investigadores sugieren que a presiones superiores de 150 MPa se producen mayores fuerzas de roce y una temperatura de salida del homogeneizador mayor,

cercana a los 70 °C, que puede hacer que se produzca una desnaturalización de parte de la proteína del suero, lo que a su vez reduce claramente su capacidad emulsificante dentro de la emulsión. Se sugiere además que es posible que la ausencia de un segundo ciclo de homogeneización (muestras presurizadas a 300 MPa) que prevenga la agregación de las nuevas gotas formadas, pueda contribuir a un mayor tamaño y distribución de las gotas en la emulsión (Floury y col., 2000). En conclusión, los resultados no suelen ser claros y pueden variar con la proporción de los diferentes componentes en la emulsión. En general, el tamaño de la gota suele ser estable en un cierto rango de presión e incrementar su tamaño con el nivel de presión aplicado y la temperatura de entrada y salida de la máquina de UHPH (Desrumaux y Marcand, 2002).

#### **5.4. Efecto sobre las propiedades y componentes de la leche.**

Empleando la válvula desarrollada por *Stansted*, también se ha estudiado el efecto de la UHPH sobre el tamaño del glóbulo de grasa y de la micela de caseína de leche cruda de vaca, y también algunas de sus propiedades, como el pH, la capacidad de coagulación y el color. En general, el tamaño del glóbulo de grasa disminuye cuando se incrementa el nivel de UHPH aplicado (50, 100, 150, 200 MPa). A presiones de tratamiento iguales o superiores a 100 MPa, el tamaño del glóbulo graso es significativamente diferente de las muestras de leche control (no tratadas) de las tratadas a 50 MPa. El tamaño del glóbulo graso oscila entre 5,74 y 1,35  $\mu\text{m}$  en leches tratadas a 50 y 200 MPa respectivamente, en muestras presurizadas utilizando solo la primera válvula de alta presión. En muestras de leche presurizadas utilizando el mismo nivel de presión, pero distribuido en las dos válvulas del equipo *Stansted*, se observó el mismo comportamiento, con un tamaño de glóbulo graso que osciló entre 5,49 y 1,07  $\mu\text{m}$  para 50 y 200 MPa, respectivamente. La temperatura de entrada de la leche a la máquina de UHPH también puede afectar el tamaño del glóbulo graso, ya que al realizar un precalentamiento de la leche el tamaño del glóbulo graso disminuye

y no se diferencia del nivel de presión aplicado. En muestras presurizadas a 50 MPa, con una temperatura de entrada de 48 °C, se observó un tamaño de glóbulo graso de 0,90  $\mu\text{m}$ , el cual no se diferenció significativamente de 0,74  $\mu\text{m}$  de muestras presurizadas a 200 MPa a una temperatura de entrada de 6,7 °C (Hayes y Kelly, 2003a).

El tamaño de la micela de caseína en leches desnatadas no muestra cambios a presiones inferiores o iguales a 150 MPa por un ciclo, y solo la disminución del tamaño de un 5 % en muestras tratadas a 200 MPa empleando un homogeneizador de tecnología *Stansted* (Hayes y Kelly, 2003a). Por otro lado, en investigaciones utilizando leche cruda de vaca presurizada a 200 MPa, con una temperatura de entrada de 28 °C, se ha descrito una disminución de 125 a 150 nm en el tamaño de la micela de caseína en muestras presurizadas (Kheadr y col., 2002). En estudios empleando leche en polvo desnatada reconstituida y presurizada a 186 MPa, con un equipo de tecnología *Avestin*, se observó que a medida que se incrementó el número de ciclos, hasta un máximo de 6, el tamaño de la micela de caseína disminuyó (Sandra y Dalgleish, 2005).

Este comportamiento es diferente cuando se aplican HHP, ya que el tamaño promedio de la micela de caseína no se ve afectado a presiones de 200 MPa, pero sí a presiones superiores a 300 MPa (Huppertz y col., 2004b; Huppertz y col., 2002). Por otra parte, la UHPH hace que la  $\kappa$ -caseína y la  $\alpha$ -caseína de la micela sean más solubles, posiblemente debido a la ruptura de interacciones hidrófobas, o a los efectos mecánicos de cizalla observados en las proteínas más cercanas a la superficie de las micelas, cuando se aplica el tratamiento. Además, la UHPH es capaz de modificar las propiedades estructurales de la micela de caseína y la formación de complejos solubles en la leche. La manipulación de estos cambios inducidos por UHPH se pueden utilizar para abrir nuevas posibilidades de investigación y desarrollo de nuevos productos alimenticios empleando UHPH (Sandra y Dalgleish, 2005; Kheadr y col., 2002).

La aplicación de UHPH a presiones inferiores o iguales a 200 MPa y temperaturas de entrada entre 6-10 °C, no produce desnaturalización de las proteínas

del suero en muestras de leche cruda de vaca con un porcentaje de grasa del 4 %. Además, se ha indicado que la estructura secundaria de la  $\beta$ -lactoglobulina no se ve modificada a presiones de 140 MPa, sugiriendo que la estructura de la proteína se estabiliza por diferentes interacciones electrostáticas, antes y después del tratamiento de UHPH (Subirade y col., 1998). Por el contrario, utilizando tratamientos de HHP, se produce desnaturalización de la  $\beta$ -lactoglobulina a presiones superiores de 100 MPa, pero la  $\alpha$ -lactoalbumina es resistente a la desnaturalización a presiones superiores de 500 MPa (Huppertz y col., 2002; Huppertz y col., 2004a).

El pH de la leche almacenada a 4 °C después de la presurización, a una temperatura de entrada de aproximadamente 8 °C, decrece a medida que se produce un incremento de la presión de tratamiento de acuerdo al siguiente orden: 200=150 MPa >100 MPa >50 MPa. Esta disminución del pH está relacionada, posiblemente, con la acción de las enzimas propias de la leche, como las lipasas, combinado con la reducción del tamaño del glóbulo graso. De ahí la mayor área de superficie interfacial de la grasa y el mayor potencial para la lipólisis, que puede ocurrir por acción de las enzimas (Hayes y col., 2005; Hayes y Kelly, 2003a).

Otro de los parámetros donde se han realizado algunos estudios es el color. La UHPH y la homogeneización convencional pueden modificar los parámetros de color (“*L*”, “*a*” y “*b*”) de la leche de vaca. Presiones de homogeneización convencional de 18 MPa, o de UHPH de 100, 150 y 200 MPa, pueden modificar la claridad de la leche (valor *L*), en comparación con muestras controles. En los estudios se indica que los valores “*L*”, en muestras tratadas por UHPH a 100 y 200 MPa, no fueron significativamente diferentes de las muestras tratadas por homogeneización convencional a 18 MPa. Los otros parámetros que describen el color: “*a*” (rojez al verdor) y “*b*” (amarillez al azul), en muestras tratadas con homogeneización convencional y UHPH empleando una o ambas válvulas, no fueron diferentes de las muestras no tratadas (Hayes y col., 2005; Hayes y Kelly, 2003a).

Las propiedades de coagulación de la leche de vaca también pueden ser modificadas cuando se aplica UHPH. En general, cuando se evalúan los parámetros de

coagulación en muestras tratadas por UHPH, el tiempo de formación del gel disminuye, mientras que la tasa de firmeza de la cuajada desuerada, y la firmeza del gel después de 2.400 segundos, aumentan en comparación con muestras no tratadas, las cuales mostraron un mayor tiempo de coagulación y una menor tasa de firmeza de cuajada desuerada, y firmeza después de 2.400 segundos de coagulación. Muestras homogeneizadas a presiones de 200 MPa mostraron una firmeza significativamente mayor de la cuajada desuerada y firmeza del gel después de 2.400 segundos, en comparación con muestras presurizadas a presiones mas bajas (50 y 100 MPa) y muestras no presurizadas. Además, cuando se aplicó el mismo nivel de presión (200 MPa), pero distribuido en las dos válvulas, la leche presento un menor tiempo de formación del gel y una mayor tasa de firmeza de la cuajada desuerada y firmeza del gel después de 2.400 segundos, en comparación con las muestras presurizadas a 200 MPa usando una sola válvula (Hayes y col., 2005; Hayes y Kelly, 2003a).

## **5.5. Efecto sobre las enzimas de los alimentos**

### **5.5.1. Efecto sobre la fosfatasa alcalina**

Los estudios del efecto de la UHPH sobre las enzimas en alimentos fluidos son limitados, y están centrados principalmente en leche y zumos. En la leche, la fosfatasa alcalina se encuentra asociada al material fosfolipídico presente en la pseudo-membrana de los glóbulos grasos. Tiene un pH optimo de actividad de 9,75, y se destruye progresivamente por el calor, alcanzando su destrucción total tras 30 minutos de tratamiento a 62,8°C, resultando estas condiciones ligeramente superiores a las requeridas para inactivar microorganismos patógenos presentes en la leche, entre ellos *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burneti*. Por lo tanto, es una enzima que se utiliza como indicador de una correcta pasteurización de la leche (Valbuena y col., 2004).

En general, la actividad de la fosfatasa alcalina disminuye cuando se incrementan el nivel de presión y la temperatura de entrada de la muestra en el equipo de UHPH (Datta, y col., 2005). Se ha observado que la leche de vaca tratada por UHPH, con presiones de entre 50-200 MPa y temperaturas de entrada de entre 6-9 °C, se ha detectado actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Sin embargo, los ensayos para detectar la actividad de la enzima en estos estudios se realizaron por una técnica cualitativa, por lo que una inactivación parcial de esta enzima por acción del tratamiento en estas condiciones de temperatura es posible que haya ocurrido. Además, los resultados de estos estudios sugieren que la aplicación UHPH a leche entera de vaca, a presiones inferiores o iguales a 200 MPa, no sería equivalente al tratamiento térmico aplicado durante la pasteurización HTST (*high temperature short time*), donde la inactivación enzimática es total (Hayes y Kelly, 2003b). En cambio en muestras de leche pasteurizadas y homogeneizadas de forma convencional, y muestras tratadas por UHPH a 200 y 250 MPa, con una temperatura de entrada de 45 °C, no se detectó actividad de la fosfatasa alcalina, cuando se empleó para su determinación una prueba cuantitativa rápida. Sin embargo, en muestras tratadas a presiones menores (150 MPa), y con una temperatura de entrada de 45 °C, la leche mostró una actividad enzimática remanente de un 29 % (Hayes y col., 2005). Por otra parte, en leche cruda de vaca tratada a 200 MPa, con diferentes temperaturas de entrada (entre 10 y 50 °C), se observó la completa inactivación de la enzima cuando la temperatura de salida de la leche de la máquina de UHPH alcanzó los 70 °C, la cual correspondió a una temperatura de entrada de 35 °C (Datta, y col., 2005). En definitiva, los pocos resultados disponibles hasta la actualidad en UHPH, indican que una inactivación completa de la enzima fosfatasa alcalina puede alcanzarse a presiones superiores de 250 MPa en combinado con temperaturas moderadas (20 a 30 °C) o a presiones de 200 MPa con temperaturas de entrada a partir de 45 °C. La fosfatasa alcalina se ha mostrado como una enzima resistente a los tratamientos por alta presión hidrostática de leche cruda a 400 MPa por 60 minutos y 20 °C, aunque tratamientos aplicados a

temperaturas y presiones mayores, generalmente pueden incrementar el nivel de inactivación de la enzima (López-Fandiño y col., 1996).

### **5.5.2. Efecto sobre la lactoperoxidasa**

La leche es un producto muy rico en el enzima lactoperoxidasa, llegando a representar cerca del 1% del total de las proteínas séricas. Posee un pH óptimo de actividad de 6,8 y se inactiva en forma parcial por calentamiento a temperaturas entre 74-77 °C por un minuto, alcanzando una inactivación total a partir de una temperatura de 78 °C (Valbuena y col., 2004; Kameniy col., 2002). Una completa inactivación de la lactoperoxidasa también puede ocurrir en leche, por calentamientos a 70 °C por 50 minutos, a 72 °C por 1-5 minutos o a 80 °C por 1,0 segundo (Hayes y col., 2005). Esta propiedad se utiliza como base para detectar sobrecalentamiento de la leche pasteurizada, ya que su ausencia indica que durante el proceso de pasteurización se emplearon temperaturas superiores a las permitidas en la legislación, incurriendo en un sobrecalentamiento (Valbuena y col., 2004).

La actividad de la enzima lactoperoxidasa también puede ser afectada por otros tratamientos, tales como la UHPH, y en función de la temperatura de entrada de la muestra. La actividad de esta enzima decrece con el incremento de la temperatura de entrada de la muestra en la máquina de UHPH (Datta, y col., 2005). Muestras de leche tratadas por UHPH a 150 y 200 MPa, con una temperatura de entrada de 45 °C, mantienen el 91 y el 34 % de su actividad enzimática respectivamente. Por el contrario, muestras de leche tratadas a las mismas condiciones de temperatura, pero a presiones de 250 MPa, muestran una inactivación completa de la enzima (Hayes y col., 2005). Por otra parte, muestras de leche cruda de vaca tratadas a 200 MPa, con temperaturas de entrada entre 10 y 50 °C, mostraron una inactivación completa de la enzima cuando la muestra alcanzo una temperatura de salida de 80 °C, que correspondió a una temperatura de entrada de 50 °C (Datta, y col., 2005). La temperatura de salida en muestras tratadas a 200 y 250 MPa fue de 77 °C y 84 °C



respectivamente, con un tiempo de retención aproximado de 20 segundos, lo que indica que la inactivación de la lactoperoxidasa a presiones mayores o iguales de 200 MPa en equipos sin un adecuado control de la temperatura, puede deberse al incremento de la temperatura durante el proceso y no al nivel de presión aplicado en el procesamiento (Hayes y col., 2005).

### **5.5.3. Efecto sobre la lipasa**

En la leche bovina, la lipasa se encuentra en gran parte unida a la micela de caseína. No ataca a los glicéridos de los glóbulos grasos salvo que su membrana este dañada, como ocurre en el proceso de homogeneización. La actividad de estas enzimas no es deseable en la leche, ya que pueden ocasionar procesos de lipólisis con el consecuente sabor a rancio (Datta, y col., 2005). Es importante destacar que la lipasa aparentemente, no se inactiva, o sólo lo es un pequeño porcentaje, a presiones por debajo de 200 MPa y temperaturas de entrada de entre 6-10 °C (Hayes y col., 2005; Hayes y Kelly, 2003a), lo que favorece que ocurran fenómenos de lipólisis durante el almacenamiento de leches tratadas con estas condiciones de presiones y temperaturas. En leche de vaca tratada a 200 MPa, con diferentes temperaturas de entrada de la muestra (entre 10 y 50 °C), se observó una completa inactivación de la lipasa cuando la leche alcanzó una temperatura de salida de 71 °C, que correspondía a una temperatura de entrada de 35 °C (Datta, y col., 2005). En tratamientos por calor a 70 °C por 15 segundos, se ha encontrado hasta un 2 % de actividad residual de las lipasas en leche (Andrews y col., 1987), mientras que aplicando 200 MPa de presión, con temperaturas de entrada mayores de 35 °C, que correspondían a temperaturas de salida superiores a 71 °C, no se observó ninguna actividad enzimática remanente (Datta, y col., 2005).

Se desconoce el comportamiento de la actividad de la lipasa con combinaciones de presiones y temperaturas superiores a las estudiadas. Se cree que, al igual que ocurre para otras enzimas, combinando mayores temperaturas de entradas (entre 50 y

60 °C) y presiones por encima de 200 MPa se pueden alcanzar temperaturas de salida en la máquina de UHPH superiores a 80 °C, lo que garantizaría una completa inactivación enzimática, reduciendo el riesgo de reactivación durante el almacenamiento, lo que puede contribuir a lograr una inactivación estable en el tiempo de estos enzimas.

#### 5.5.4. Efecto sobre la plasmina

Esta enzima se agrupa dentro de las serin-proteinasas, que alcanza, la leche desde la sangre en forma de plasminógeno, y aunque inicialmente sólo una pequeña porción es activa en la leche fresca, ésta se activa progresivamente a partir de un factor presente en la leche. Se encuentra asociada a las micelas de caseína, y su actividad óptima se da a una temperatura de 37 °C y un pH ligeramente alcalino. Las proteínas lácteas más sensibles a la plasmina son las caseínas  $\beta$  y  $\alpha_{s2}$ , pero también puede atacar en menor grado a la caseína  $\alpha_{s1}$ , mientras que las proteínas del suero  $\alpha$ -lactoalbumina y la  $\beta$ -lactoglobulina no son sensibles a su actividad. La plasmina no se inactiva durante la pasteurización y una parte puede resistir los tratamientos UHT. Se ha observado incluso, que con la pasteurización a 72 °C por 15 segundos (HTST) su actividad puede incrementar. La acción de la plasmina puede ocasionar serios defectos en los productos lácteos sometidos a UHT, como aparición de sabores amargos, debidos a los pépticos hidrófobos de bajo peso molecular, y a cambios en la viscosidad y aspecto (Korycka-Dahl y col., 1983).

La homogeneización convencional de la leche (18 MPa), provoca una disminución de aproximadamente un 40 % de la actividad de la plasmina, en comparación con muestras de leche no presurizadas. Se ha observado que muestras de leche de vaca tratadas por UHPH a presiones inferiores o iguales 200 MPa, con una temperatura de entrada de 6-9 °C, pueden conservar alrededor de un 35 % de la actividad original de la plasmina (Hayes y Kelly, 2003b). La actividad de esta enzima decrece significativamente a presiones superiores a 150 MPa, si se compara con la

homogeneización convencional (18 MPa) y con muestras controles no tratadas. En muestras de leche cruda presurizadas a 150 y 250 MPa, con una temperatura de entrada de 45 °C, se produjo una reducción de 85 y 95 % de la actividad de la plasmina, respectivamente (Hayes y col., 2005). Por otra parte, muestras presurizadas a presiones menores de 100 MPa, con temperaturas de entrada entre 6-9 °C, mostraron una actividad significativamente menor de la plasmina que muestras tratadas por homogeneización convencional (Hayes y Kelly, 2003b), lo que sugiere que las fuerzas de cizalla, roce, turbulencia y coalición en el interior de la válvula de UHPH juegan un papel importante en la inactivación de la plasmina a presiones menores a 150 MPa. Por otro lado, en leche de vaca tratada a 200 MPa y diferentes temperaturas de entrada de la muestra (entre 10 y 50 °C), se observó una inactivación del 90 % de la plasmina cuando la leche alcanzó una temperatura de salida de 80 °C, que correspondió a una temperatura de entrada de 50 °C (Datta, y col., 2005). Sin embargo, muestras de leche sometidas a tratamientos de UHPH con un mayor número de pases a través del homogeneizador y mayor temperatura de entrada, pueden mostrar un mayor nivel de inactivación de la plasmina.

#### **5.5.5. Efecto sobre la pectin metilesterasa**

La pectin metilesterasa es la enzima responsable de la pérdida de la opalescencia del zumo de naranja durante el almacenamiento. Es resistente al calor, y en gran parte responsable de los problemas de la opalescencia que se presentan en la industria del zumo. De hecho, en la industria se establecen tablas de pasteurización del zumo de naranja en función de su resistencia a la destrucción por acción del calor, al requerir más energía que la necesaria para asegurar la calidad microbiológica del producto (Lacroix y col., 2005). En estudios donde se establece el efecto individual de la UHPH, o en combinación con un precalentamiento, sobre la actividad de la pectin metilesterasa, se reporta que a 170 MPa en zumo de naranja con un pH de 3,80, el tratamiento es capaz de reducir un 20 % la actividad de la enzima. Un mayor número

de pases a través del equipo (3 y 5 pases), usando las mismas condiciones de presión y pH, no incrementaron significativamente el nivel de inactivación, en comparación con muestras tratadas usando un solo pase. El precalentamiento de la muestra (50 °C por 10 minutos) previo a la presurización a 170 MPa, en combinación con un pH 3.0, redujo en un 90 % la actividad de la pectin metilesterasa, mientras que la presurización en las mismas condiciones de temperatura y presión, pero con un pH más alto (4,0), sólo redujo la actividad de la enzima en aproximadamente un 30 % cuando se usaron 5 pases. Los resultados mostrados sugieren que la inactivación de la pectin metilesterasa se debe principalmente a los efectos del precalentamiento y al bajo pH, y en menor grado a la UHPH. Sin embargo, el incremento de la estabilidad y la opalescencia del zumo de naranja durante el almacenamiento, sugieren que puede haber un efecto sinérgico entre el tratamiento de UHPH, el bajo pH y el precalentamiento (Lacroix y col., 2005).

## **5.6. Efecto sobre los microorganismos**

### **5.6.1. Mecanismo de inactivación de la UHPH sobre los microorganismos**

La bibliografía disponible referente a la inactivación de microorganismos por UHPH, usando equipos con un doble sistema de válvula, y presiones superiores o iguales a 300 MPa es limitada. Los efectos de la UHPH en las células bacterianas no son aun bien conocidos, pero probablemente los microorganismos son destruidos por la pérdida repentina de presión, la torsión, el roce y, más probablemente, por cavitación y por las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de gas durante la aplicación de UHPH. El colapso en el líquido de tales cavidades podría transmitir varias fuerzas localizadas a partículas de superficie, o inclusive a células bacterianas (Guerzoni y col., 1999; Lanciotti y col., 1996; Lanciotti y col., 1994; Popper y Knorr, 1990). Se ha mostrado que la UHPH puede inactivar microorganismos, quizás debido a varios mecanismos, pero la pared celular parece ser

el objetivo principal de los daños ocasionados por la aplicación de este tipo de tratamientos, aunque también pueden ocurrir la inactivación de ciertos enzimas intracelulares (Kheadr y col., 2002; Vachon y col., 2002). Durante la aplicación de la UHPH ocurre un súbito incremento de la permeabilidad celular o se produce una ruptura de la membrana, lo que ocasiona una lesión irreversible y la muerte celular, impidiendo una regeneración o reactivación de la célula como ocurre con la HHP, lo que, en teoría, convierte a esta tecnología en una técnica más efectiva y segura (Vachon y col., 2002).

Se ha reportado que la severidad de los daños en la célula aumenta con el nivel de presión y el número de pases al cual es sometida la matriz inoculada con el microorganismo (Vannini y col, 2004; Vachon y col, 2002), observándose ruptura de la membrana y descargas del contenido citoplasmático de la célula. A presiones de 300 MPa con cinco pases, se observaron muy pocas células intactas y la mayoría aparecieron rotas, con vaciamiento parcial o completo de su contenido, producto de los daños ocasionados a su pared celular (Vachon y col, 2002).

## **5.6.2. Factores que afectan la inactivación de microorganismos tratados por UHPH**

### **5.6.2.1. Tipo de microorganismo**

Existe una clara diferencia en la resistencia mostrada entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. A presiones de hasta 300 MPa las bacterias Gram positivas han demostrado ser significativamente más resistentes que las bacterias Gram negativas a los tratamientos por UHPH (Diels y col., 2003; Vachon y col, 2002; Wuytack y col., 2002). Se ha reportado que con la aplicación de un tratamiento de UHPH con 100 MPa, *Escherichia coli* ha sido más sensible que *Streptococcus lactis*, mostrando 3 y 1 unidades logarítmicas de reducción, respectivamente (Popper y Knorr, 1990). Por otro lado, otros investigadores (Lanciotti y col., 1994) con las

mismas condiciones de presión (100 MPa), reportan una reducción de la población de células de 2, 3 y 6 unidades logarítmicas para *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Yarrowia lipolytica*, respectivamente. La levadura *Yarrowia lipolytica* resulto ser mucho mas sensible que las bacterias Gram negativas, mostrando el doble de reducción en las mismas condiciones de tratamiento (Lanciotti y col., 1994).

En una presión de trabajo de 200 MPa, con una temperatura de entrada de 25 °C, la inactivación de las bacterias Gram positivas fue inferior a 1,0 unidad logarítmica, mientras que en las mismas condiciones se alcanzaron entre 2,0 y 4,6 unidades logarítmicas de reducción para bacterias las Gram negativas. Dentro del grupo de las bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus plantarum* fueron más resistentes, mientras que *Listeria innocua* y *Leuconostoc dextranicum* fueron ligeramente más sensibles, pero sin superar las 2,0 unidades logarítmicas de reducción. Entre las bacterias Gram negativas *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica* fueron mas resistente que *Escherichia coli* y *Salmonella flexneri*, mientras que *Pseudomona fluorescens* fue la mas sensible a la UHPH (Wuytack y col., 2002). En otros estudios (Diels y col., 2003), donde se ha comparado la resistencia entre *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* a presiones entre 100 y 300 MPa, los investigadores observaron los mismos resultados de estudios anteriores, en referencia a la mayor resistencia de *S. aureus* y en general de las bacterias Gram positivas sobre las Gran negativas.

Las esporas bacterianas, por otro lado, parecen ser muy resistentes a la UHPH, por lo menos a temperaturas de entrada entre 33 y 50 °C y presiones de hasta 200 MPa. Muestras de helado de crema inoculadas con esporas de *Bacillus licheniformis* tratadas por UHPH mostraron una reducción menor de 1,0 unidad logarítmica a presiones de 200 MPa (Feijoo et al., 1997). Este mismo comportamiento se ha observado para las esporas de *Bacillus cereus* tratadas por HHP inoculadas en quesos modelo (López y col., 2003), donde se reportó una reducción menor a 1,0 unidad logarítmica a 400 MPa. De acuerdo a estos resultados, se puede pensar que no será posible alcanzar una esterilización en fluidos alimenticios con la aplicación de UHPH

a temperaturas bajas y presiones inferiores a 200 MPa, requiriendo de un precalentamiento que permita la germinación de las esporas, previo a la aplicación de la UHPH. Sin embargo, una reducción de la microbiota vegetativa es potencialmente interesante desde que los tratamientos por UHPH puede ser capaces de prolongar el período de conservación y mejorar la seguridad microbiológica de los alimentos, pudiendo reducir la necesidad de utilizar otros tratamientos complementarios en el proceso de higienización (calor, irradiación) (Wuytack y col., 2002).

#### 5.6.2.2. Temperatura de entrada de la muestra

El nivel de inactivación microbiana en muestras tratadas por UHPH incrementa con la temperatura de entrada de la matriz a la máquina (Thiebaud y col., 2003; Vachon y col, 2002). En un estudio llevado a cabo empleando leche cruda de vaca, presurizada a diferentes temperaturas de entrada (4, 14 y 24 °C), el nivel de inactivación microbiano fue mayor a 24 °C en comparación con las otras temperaturas en las mismas condiciones de presión. Cuando las muestras de leche fueron presurizadas a 300 MPa se observó una diferencia de 2 unidades logarítmicas en la reducción microbiana entre las muestras con una temperatura de entrada en la máquina de UHPH de 4 y 24 °C. Las muestras presurizadas a mayor temperatura mostraron alrededor de 3,0 unidades logarítmicas de reducción a 300 MPa, mientras que las muestras presurizadas a 4 °C solo mostraron 1,0 unidad logarítmica de reducción de la microbiota inicial en la leche cruda (Thiebaud y col., 2003).

Una mayor reducción de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* O157:H7 también fue observada en muestras de leche y PBS presurizadas a 200 MPa a una mayor temperatura. Cuando se comparó el nivel de reducción observado en PBS para estos microorganismos, a diferentes temperaturas de entrada (4, 25, 45 y 55 °C), la inactivación microbiana fue mayor a 55 °C para todos los microorganismos, alcanzando hasta aproximadamente 9 unidades logarítmicas para *S. enteritidis*. Cuando las muestras de PBS fueron calentadas a 45 y 55 °C, se

observaron reducciones adicionales de 2 y 4 unidades logarítmicas en el número de supervivientes para *S. enteritidis*, en comparación con las muestras presurizadas a 25 °C. En muestras de leche cruda presurizadas a 25, 45, 55, y 60 °C se observó un comportamiento similar, mostrando cada uno de los microorganismos inoculados en la leche el mayor nivel de inactivación a 60 °C y 200 MPa de presión. El calentamiento a 60 °C condujo a una reducción adicional de 1,2 y 1,5 unidades logarítmicas en los recuentos de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, respectivamente, en comparación con las muestras tratadas a 55 °C. Adicionalmente, *L. monocytogenes* mostró una mayor reducción a la máxima temperatura de entrada con las mismas condiciones de tratamiento, alcanzando hasta aproximadamente 6 unidades logarítmicas de reducción en la leche presurizada (Vachon y col, 2002).

### 5.6.2.3. Tipo de matriz

Se ha mostrado que el grado de inactivación de los microorganismos tratados por UHPH también puede depender del tipo de matriz alimenticia donde estos se encuentren (Vachon y col, 2002; Wuytack y col., 2002). En una investigación donde se evaluó la efectividad de la UHPH para inactivar microorganismos patógenos transmitidos por alimentos e inoculados en diferentes matrices, tales como solución de PBS y leche (Vachon y col., 2002), los investigadores reportaron diferencias significativas en los valores de letalidad entre las dos matrices. El grado de inactivación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* O157:H7 fue significativamente menor en muestras de leche que en muestras de PBS, presurizadas en las mismas condiciones. Estas diferencias podrían ser atribuidas, según los autores, a las disparidades existentes en la composición de las matrices, y a que algunos componentes de la leche podrían ofrecer algún tipo de protección a los microorganismos contra el efecto letal de la presurización. Un comportamiento similar ha sido observado para *Listeria monocytogenes* inoculada en leche y PBS, pero tratada por HHP (Styles y col., 1991), donde se ha observado que el microorganismo resiste



mejor la presión en leche que en PBS. Entre los diferentes constituyentes de la leche, la grasa podría ser uno de los que provea un efecto protector a los microorganismos en condiciones desfavorables. Puede ser las bacterias que se adosen al glóbulo graso, lo cual hace que se reduzca el efecto letal de la HHP. Solo una pequeña reducción de *L. monocytogenes* fue observada en leche de oveja con un 6 % de grasa tratada por HHP (Gervilla y col., 1997b).

Recientemente se ha reportado (Kheadr y col., 2002) que tratamientos por UHPH de leche con diferentes porcentajes de grasa (3,4, 2 y 0 %), mostraron diferentes niveles de reducción de la carga microbiana. Un nivel de inactivación de 2, 3 y 4 unidades logarítmicas de reducción para *L. innocua* fue mostrado en leche presurizada a 200 MPa con 3,4, 2 y 0 % de grasa, respectivamente. Los investigadores atribuyen el bajo nivel de reducción encontrado en la leche completa a un efecto protector de la grasa de la leche sobre los microorganismos. Por otra parte, en otro estudio empleando una matriz diferente, como el PBS (Wuytack y col., 2002), se ha observado reducciones menores de 1,0 unidad logarítmica para *L. innocua* tratada al mismo nivel de presión (200 MPa), lo que indica que existen claras diferencias en los niveles de inactivación entre matrices, que pueden estar relacionadas con su composición o con el efecto protector o interferente que pudieran tener algunos componentes durante los procesos de presurización de las muestras.

#### **5.6.2.4. Nivel de presión**

La inactivación microbiana en muestras alimenticias fluidas debido a la aplicación de UHPH, también se puede ver afectada por el nivel de presión aplicado sobre el alimento. En la UHPH, cuando se aplican tratamientos superiores de 200 MPa, se puede inducir una significativa inactivación de la microbiota en la leche y en los productos lácteos (Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002). Los equipos de UHPH disponibles actualmente permiten alcanzar presiones máximas de tratamiento de 400 MPa, presiones donde los fabricantes de los equipos no recomiendan presurizar

frecuentemente, ya que son las condiciones límites de resistencia de los materiales utilizados para la fabricación de las válvulas. Los pocos estudios disponibles emplean como presiones máximas 300 MPa, presiones en las cuales se han reportado las mayores reducciones. En estudios llevados a cabo utilizando leche y PBS como matrices inoculadas con *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc dextranicum*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella flexneri* y *Salmonella enteritidis* y también en leche cruda con su microbiota saprofita, reportan un mayor nivel de inactivación a presiones máximas de tratamiento de 300 MPa.

En general, para todos los microorganismos inoculados en las diferentes matrices y para la microbiota presente en leche cruda, la letalidad fue mayor a medida que se incremento el nivel de presión de los tratamientos de UHPH (Diels y col., 2004; Diels y col., 2003; Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002; Wuytack y col., 2002). Un comportamiento similar se ha observado para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomona fluorescens* tratadas por HHP, donde se reporta un mayor nivel de inactivación a medida que se incrementa el nivel de presión aplicado a muestras de leche de oveja y mini quesos inoculadas con estos microorganismo (De lamo-Castellví y col., 2005a; De lamo-Castellví y col., 2005b; López y col., 2003; Gervilla y col., 2000; Gervilla y col., 1999a; Gervilla y col., 1999b; Gervilla y col., 1997a; Gervilla y col., 1997b)

#### 5.6.2.5. Número de pases de tratamiento

Existen estudios donde se ha evaluado la efectividad de UHPH para inactivar microorganismos patógenos transmitidos por alimentos e inoculados en diferentes matrices utilizando uno o varios pases. Estos estudios han utilizado, como máximo, 5 pases y se han reportado diferencias significativas en los valores de letalidad cuando

se aplica la UHPH sobre los microorganismos inoculados en las matrices usando diferente número de pases. (Thiebaud y col., 2003; Vachon y col., 2002; Wuytack y col., 2002). En uno de estos estudios, llevado a cabo utilizando leche y PBS aplicando uno, tres y cinco pases a muestras inoculadas con *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, los investigadores observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en los niveles de letalidad entre pases. En general, para todos los microorganismos la letalidad fue mayor a medida que se incremento el número de pases, mostrando el mayor nivel de inactivación para *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* O157:H7 con cinco pases de tratamiento a 300 MPa (Vachon y col., 2002). La aplicación de un segundo pase a una muestra de leche cruda de vaca produjo una reducción adicional de la microbiota, proporcional al primer pase, alcanzando como máximo 1,0 unidad logarítmica con una temperatura de entrada de 24 °C (Thiebaud y col., 2003). Resultados similares fueron observados en otro estudio usando *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* inoculadas en PBS, cuando se aplicaron 1, 2 y 3 pases de tratamiento. A medida que se incrementó el número de pases, aumentó la reducción microbiana, alcanzando una reducción proporcional para cada uno de los pases al pase anterior (Wuytack y col., 2002).

Similares resultados se han observado en muestras de leche de oveja inoculadas con *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7, tratadas por HHP donde se observó un mayor nivel de inactivación microbiana a medida que se incrementó el tiempo de exposición o estancia de las muestras de leche inoculadas con estos microorganismos en el equipo (Gervilla y col., 1997a; Gervilla y col., 1997b).

### **5.6.3. Daños subletales causados en microorganismos tratados por UHPH**

Los pocos resultados existentes hasta la fecha con los medios de detección empleados indican que la UHPH, en las condiciones de presión, temperatura y número de pases estudiados, no causa ningún tipo de daño subletal aparente en los microorganismos. En un estudio llevado a cabo utilizando *Staphylococcus aureus* y

*Yersinia enterocolitica* inoculados en PBS y presurizado a 300 y 200 MPa respectivamente, los investigadores reportan que ninguno de los componentes selectivos empleados (pH, sodio dodecil sulfato y NaCl) causó un incremento en la reducción de estos microorganismos, en comparación con los medios no selectivos, lo que indica que la UHPH, bajo las condiciones del estudio, no causó daños subletales aparentes en estos microorganismos (Wuytack y col., 2002). Además, el mismo grupo de investigación observó en otro estudio (Wuytack y col., 2003) que los tratamientos por UHPH causaron muy poco ó ningún daño subletal en *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, cuando se inoculó en PBS y fue presurizada a 100 y 200 MPa, con una temperatura de entrada de 25 °C. Adicionalmente, estos investigadores observaron que la UHPH causó el nivel más bajo de lesiones subletales, en comparación a la HHP, los tratamientos térmicos e incluso que los campos eléctricos pulsantes o los pulsos luminosos.

A diferencia de la UHPH, en la HHP se pueden producir una gran acumulación de daños subletales, con una posterior recuperación de las células microbianas lesionadas dependiendo de las condiciones de tratamiento y del posterior almacenamiento del alimento presurizado (De lamo-Castellví y col., 2005a; De lamo-Castellví y col., 2005b). En un estudio realizado empleando *Yersinia enterocolitica*, los investigadores reportan que varias cepas de este microorganismo fueron capaces de incrementar sus recuentos en leche desnatada en 8,0 unidades logarítmicas, tras 15 días de almacenamiento a 8 °C, en muestras que habían sido sometidas a una HHP de 500 MPa y donde aparentemente se había producido una inactivación completa después del tratamiento (De lamo-Castellví y col., 2005b). Este es el punto que marca una clara diferencia entre estas tecnologías, ya que en la UHPH este fenómeno no ocurre, al ser el tratamiento capaz de producir una inactivación completa de la célula microbiana, haciendo muy difícil su recuperación durante el posterior almacenamiento del alimento presurizado.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, A. T., Anderson, M., y Goodenough, P. W. (1987). A study of the heat stabilities of number indigenous milk enzymes. *Journal of Dairy Research*, 54(3), 237-246.
- Anónimo. (1997). Chemical disinfectants and antiseptics-basic bactericidal activity-test method and requirement (phase 1). UNE-EN-1040: 1-30.
- Anónimo. (1998a). Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - test method and requirement (phase 2 step 1). UNE-EN-1276: 1-35.
- Anónimo. (1998b). Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas. *Diario oficial de las Comunidades Europeas del 24 de abril de 1998*, L 123: 1-63.
- Anónimo. (2001). Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants use in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step2). EN 13697.
- Barsotti, L., y Cheftel, J. C. (1999). Traitement des aliments par champs électriques pulsés. 2. Aspects biologiques. *Sciences des aliments*, 19(1), 3-33.

- Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V., y Martín, O. (2002). Milk processing high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6-7), 195-204.
- Blakistone, B., Chuyate, R., Kautter, JR., Charbonneau, J., y Suit, K. (1999). Efficacy of Oxonia Active against selected spore formers. *Journal of Food Protection*, 62 (3), 262-267.
- Blancou, J. (1995). History of disinfection from early times until the end of the 18<sup>th</sup> century. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(1), 31-39.
- Bolder, N. M. (1997). Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 221-227.
- Bruins, G., y Dyer, J.A. (1995). Environmental considerations of disinfectants used in agriculture. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(1), 82-94.
- Carballo, J. (2001). Adherencia de bacterias a superficies de contacto con los alimentos. *Alimentaria*, N° 320. 19-25.
- Chirtensen, B. E. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, 10(1), 181-202.
- Collado, M.J. (1994). Métodos de control de desinfectantes. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 7(1), 81-85.

- Collado, M.J., Sobré, L., y González, J. (1998). Aspectos Básicos de la detergencia en la industria alimentaria. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 17(7), 117-122.
- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., y Nelly, A. L. (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 1-7.
- De lamo-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., y Roig-Sagués, A. X. (2005a). Behaviour of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 68(3), 528-523.
- De lamo-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., y Roig-Sagués, A. X., (2005b). Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 337-342.
- Denyer, S. P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation* 36(3-4), 227-245.
- Desrumaux, A., y Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristic. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3), 263-269.
- Dike, U. (2004). Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 137-146.

- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michels, C. W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 281-291.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michels, C. W. (2004). Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1512-1517.
- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., y Michels, C. W. (2003). Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1), 55-62.
- Dunn, J. (1996). Pulsed light and pulsed electric fields for foods and eggs. *Poultry Science*, 75(9), 1133-1136.
- Fatemi, P., y Frank, J.F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*, 62(7), 761-765.
- Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., y Martin, J. H. (1997). Effects of Microfluidizer® technology on *Bacillus licheniformis* spores in ice cream mix. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2184-2187.
- Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., y Pérez-Álvarez, J. A. (2002). Tratamientos de irradiación y su aplicación en carne y productos cárnicos. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 65(1-2), 61-64.



- Floury, J., Bellestre, J., Legrand, J., y Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part A. study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843-853.
- Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. A. V., y Legrand, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal Food of Engineering*, 58(3), 227-238.
- Floury, J., Desrumaux, A., y Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenisation on droplet size distribution and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 127-134.
- Floury, J., Legrand, J., y Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recoalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*. 59(5), 1285-1294.
- Frank, J. F., y Koffi, R. A. (1990). Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*. 53(5), 550-554.
- Gallardo, S. C., Sánchez, T. M., Gallego, A. R., González, J. A., y Rodríguez, L. A. (2002). Determinación de la actividad antibacteriana de desinfectantes y detergentes bactericidas de uso habitual en la industria alimentaria. *Alimentaria*, N° 335, 47-53
- García, F. (1988). Factores que intervienen en la higienización de la industria cárnica. *Cárnica 2000*, 55-56(7-8), 59-61.

- Gerald, M. S., y Gilbert, F. S. (1998). Hydrogen Peroxide disinfection of minimally processed fruit and vegetables. *Food Technology*, 52(2), 48-52.
- Gervilla, R., Ferragut, V., y Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 674-682.
- Gervilla, R., Sendra, E., Ferragut, V., y Guamis, B. (1999a). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* of *Lactobacillus helveticus* in ovine milk subjected to high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1099-1107.
- Gervilla, R., Felipe, X., Ferragut, V., y Guamis, B. (1997a). Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas Fluorescens* strains in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 2297-2303.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V., y Guamis, B. (1997b). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 60(1), 33-37.
- Gervilla, R., Mor-Mur, M., Ferragut, V., y Guamis, B. (1999b). Kinetic of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas Fluorescens* in ewe's milk by high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 16(2), 173-184.
- Grabhoff, A. (1997). Cleaning of heat treatment equipment. *Bulletin of the international Dairy Federation*, N° 328, 32-44.
- Gilbert, P., y Brown, M. R. W. (1995). Some perspectives on preservation and disinfection in the present day. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36(3-4), 219-226.

- Gómez-Exojo, G. (1995). Limpieza y desinfección: etapa básica en el proceso de producción. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 14(7), 97-104
- Gómez-Exojo, G. (1994). La desinfección en la industria alimentaria. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 13(9), 89-91
- Griffin, P. M., y Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology Review*, 13, 60-96.
- Gunes, G., y Tekin, M. D. (2006). Consumer awareness and acceptance of irradiated foods: Results of a survey conducted on Turkish consumers. *LWT-Food Science and Technology*, 39(4), 444-448.
- Guerzoni, M. E., Vannini, L. Chaves López, C., Lanciotti, R., Suzzi, G., y Gianotti, A. (1999). Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat chesses. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 851-862.
- Hayes, M. G., y Kelly, A. L. (2003a). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 297-305.
- Hayes, M. G., y Kelly, A. L. (2003b). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 307-313.
- Hayes, M. G., Fox, P. F., y Kelly, A. L. (2005). Potential application high pressure homogenisation in liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25-33.

- Herruzo, R. (2000). Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, Tomo CXVII, 791-806.
- Hite, B. H. (1899). The effect of high pressure in preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin*, 58, 15-35.
- Holah, J. T. (1995a). Special needs for disinfectants in food-handling establishments. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14 (1), 95-104.
- Holah, J. T. (1995b). Disinfection of food production areas. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14 (2), 343-363.
- Holah, J. T. (1995c). Progress report on CEN/TC 216/Working group 3: Disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36(3-4), 355-365.
- Holah, J. T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D., y Spenceley, H. (1990). A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology*, 11, 255-259.
- Holah, J. T. (1997). Desarrollo de métodos de ensayo para la evaluación práctica de la facilidad de limpieza en la maquinaria de elaboración de alimentos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 16(7), 99-106.
- Hugo, W.B. (1995). A brief history of heat, chemical and radiation preservation and disinfection. *International Biodeterioration & Biodegradation* 36(3-4), 197-217.
- Huppertz, T., Kelly, A. L., y Fox, P. F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12(7), 561-572.

- Huppertz, T., Kelly, A. L., y Fox, P. F. (2004a). High pressure-induced denaturation  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey. a possible mechanisms. *Journal of Dairy research*, 71(5), 489-495.
- Huppertz, T., Kelly, A. L., y Fox, P. F. (2004b). High pressure treatment in bovine milk. effects on casein micelles and whey protein. *Journal of Dairy research*, 71(1), 97-106.
- Jeffrey, D.J. (1995). Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14 (1), 57-74.
- Johnson, E. A., Nelson, J. H., y Johnson, M. (1990) Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part III technology, discussion, recommendations, bibliography. *Journal of Food Protection*, 53, 610-623.
- Kahrs, R.F. (1995). General disinfection guidelines. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(1),105-122.
- Kameni, A., Imele, H., y Mbanya, N.J. (2002). An alternative heat treatment for milk pasteurization in Cameroon. *International Journal Food Technology*, 55, 43-45.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., y Fliss, I. (2002). Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12(5), 435-446.
- Klapes, N.A., y Vesley, D. (1990). Vapor-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterling. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 503-506.

- Korycka-Dahl, M., Ribadeau, B., Chene, N., y Martal, J. (1983). Plasmin activity in milk, *Journal of Dairy Science*, 66(4), 704-711.
- Lacroix, N., Fliss, I., y Makhoul, J. (2005). Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. *Food Research International*, 38(5), 569-576.
- Lee, S-H., y Frank, J. F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* by hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection*, 54(1), 4-6.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., y Guerzoni, M. E. (1994). Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic microorganism. *Letters in Applied Microbiology*, 18(6), 319-322.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., y Guerzoni, M. E. (1996). Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letters in Applied Microbiology*, 22(3), 165-168.
- Lopez-Alonso, R., y Antolín-Giraldo, G. (2004). Envasado y conservación de alimentos. Últimas tendencias. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 187(2), 45-52.
- López-Fandiño, R., Carrascosa, AV., y Olano, A. (1996). The effect of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 929-936.
- Lopez- Pedemonte, T. J., Roig Sagués, A. X., Trujillo, A. J. Capellas, M., y Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic

pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3075-3081.

Lucore, L.A., Shellhammer, T. H., y Yousef, A. E. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 63(5), 662-664.

Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., y Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 265-272.

Luppens, S. B. I., Reig, M. W., Van der Heijden, R. W. L., Rombouts, F. M., y Abee, T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectant. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4194-4200.

Maris, P. (1995). Modes of action of disinfectants. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(1), 47-55.

Mateos, P. A. (1995). Disinfection of trucks and trailers. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(1), 171-176.

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

Mosteller, T. M., y Bishop, J. R. (1993). Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection*, 56(1), 34-41.

- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., y Balny, C. (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnology applications. *Trends in Biotechnology*, 12(12), 493-501.
- Mullerat J, Sheldon B. W., y Arlene-Klapes N. (1995). Inactivation of *Salmonella* species and other food-borne pathogens with Salmide®, a sodium chlorite-based oxyhalogen disinfectant. *Journal of Food Protection*, 58(5), 535-540.
- Ntsamaessomba, C., Bouttier, S., Ramaldes, M., Duboisbrissonnet, F., y J. Fourniat. (1997). Resistance of *Escherichia coli* growing a biofilm to disinfectants. *Veterinary Research*, 28(4), 353-363.
- Orden, J. A., Cid, D., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., García, S., Martínez, S., y De la Fuente, R. (2002). Verotoxin – producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 93(1), 29-35.
- Orihuel-Iranzo, E. J., Navarro, R. B., y Canet-Gasco, J. J. (1998). Monitorización de la limpieza y desinfección en industrias alimentarias. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 17(7), 93-97.
- Paquin, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides, *International Dairy Journal*, 9(3-6), 329-335.
- Patterson, M. F., y Kilpatrick, D.J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61(4), 432-436.



- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R., y Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58(5), 524-529.
- Popper, L., y Knorr, D. (1990). Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, 44(7), 84-89.
- Rossoni, E. M. M., y Gaylarde, C.C. (2002). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 81-85.
- Salvat, G., y Colin, P. (1995). Cleaning and disinfection in the meat industries of Europe. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(2), 329-341.
- Sandra, S., y Dalglish, D. G. (2005). Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder, *International Dairy Journal*, 15(11), 1095-1104.
- Splittstoesser, D. F., McLellan, M. R., y Churey, J. J. (1996). Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Food Protection*, 59(3), 226-229.
- Stampi, S., De Luca, G., Honorato, M., Ambrogiani, E., y Zanetti, F. (2002). peracetic acid as an alternative wastewater disinfectant to chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 725-731.

- Styles, M. F., Hoover, D. G., y Farkas, D. F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56(5), 1404-1407.
- Subirade, M., Loupil, F., Allain, A-F., y Paquin, P. (1998). Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of  $\beta$ -lactoglobulin and on its conformational properties as determined by fourier transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 8(2), 135-140.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L. Guiraud, J. P., y Cheftel, J. C. (2003). High-pressure of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427-439.
- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., y Fliss, I. (2002). Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65(2), 345-352.
- Valbuena, E., Castro, G., Lima, K., Acosta, W., Briñez, W, y Tovar, A. (2004). Calidad Microbiológica de las Principales Marcas de Leche Pasteurizada distribuidas en la Ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias*, XIV(1), 59-67.
- Van de Weyer, A., Devleeschouwer M. J., y Dony J. (1993). Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(4), 480-483.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Balde, D., y Guerzoni M. E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 123-136.

- Vázquez, J., Calero, J., Redondo, M<sup>a</sup> del R., García, J. A., y Urcelay, P. (2003). Brotes de origen alimentario en la comunidad de Madrid, factores contribuyentes al grado de cumplimiento de los prerrequisitos durante el periodo 1997-2001. *Alimentaria*, N° 349, 23-27.
- Visser, H., y Jeurnink, Th.J. M. (1997). Fouling of heat treatment equipment. *Bulletin of the international Dairy Federation*, N° 328, 7-31.
- Wang, J., y Toledo R.T. (1986). Sporicidal properties of mixture of hydrogen peroxide vapour and hot air. *Food Technology*, 40(12), 60-67.
- Wildbrett, G. (2000). La limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., y Michels, C. W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure, *International Journal of Food Microbiology*, 77(3), 205-212.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. M. J., y Michels, C. W. (2003). Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66(1), 31-37.
- Yuste, J., Capellas, M., De Lamo, S., Lopez-Pedemonte, T., Roig Sagués, A. X., Pla, R., Guamis, B., y Mor-Mur, M. (2005). Aplicaciones de altas presiones en alimentos: Aspectos microbiológicos. Combinación con otros métodos físicos y químicos. *Alimentaria*, 360(1-2), 11-16.

**CAPÍTULO**

**TERCERO**

---

**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. PROCEDIMIENTO GENERAL

En la presente memoria fueron reunidos los resultados correspondientes a cinco experimentos. El experimento 1 fue preliminar y sirvió para seleccionar y evaluar un producto desinfectante para ser utilizado posteriormente en la desinfección del homogeneizador de UHPH, así como, para establecer un procedimiento de limpieza y desinfección del homogeneizador después de haber sido utilizado para presurizar matrices inoculadas con diferentes cepas bacterianas. La primera parte de este experimento nos permitió seleccionar un producto desinfectante y practicar la evaluación de su eficacia *in Vitro* a través de una prueba de suspensión, utilizando cepas patógenas y no patógenas de los microorganismos que posteriormente serían empleados en las evaluaciones de la eficacia para reducir la carga bacteriana usando UHPH. La segunda parte consistió en evaluar la eficacia del producto desinfectante sobre el homogeneizador contra las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos de UHPH. Las evaluaciones se realizaron hasta alcanzar una esterilización interna de la máquina que nos permitiera garantizar los resultados de los posteriores ensayos de reducción en las diferentes matrices aplicando UHPH, además de establecer un proceso de desinfección para ser utilizado en el homogeneizador de UHPH por los demás miembros del CERPTA.

Los experimentos 2, 3, 4 y 5 se realizaron con la intención de evaluar la capacidad de la UHPH para reducir la carga bacteriana de microorganismos Gram positivos y Gram negativos inoculados en diferentes matrices, como leche entera, desnatada y zumo de naranja. En todos los experimentos de UHPH se evaluó el efecto de la temperatura de entrada en el grado de inactivación de los microorganismos, así como la capacidad de estos para sobrevivir durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración tras los tratamientos de presurización. Además, se evaluó la capacidad de la UHPH de producir daños subletales en las diferentes cepas bacterianas, empleando medios de cultivo enriquecidos y estresantes. Adicionalmente en los experimentos 2, 4 y 5 se evaluó el efecto del tipo de matriz en la letalidad y en la

evolución de los recuentos durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Los experimentos 3, 4 y 5 además permitieron comparar la resistencia a la UHPH entre cepas patógenas y no patógenas de un mismo género inoculadas en diferentes matrices. En la Tabla 3 se esquematiza de manera general los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral.

**Tabla 3.** Esquema general de los experimentos realizados

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
Ámbito	Evaluación desinfectante protocolización limpieza desinfección	Evaluación eficacia bactericida tratamientos UHPH	Evaluación eficacia bactericida tratamientos UHPH	Evaluación eficacia bactericida tratamientos UHPH	Evaluación eficacia bactericida tratamientos UHPH
Cepas empleadas	En Pruebas de suspensión : <i>S. aureus</i> <i>S. carnosus</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> O157:H7 <i>L. innocua</i> <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i> <i>S. carnosus</i>
Matrices utilizadas	Como interferentes: Leche Zum Chocolate Huevo	Leche entera Zum naranja	Leche entera Leche desnatada	Zum naranja	Leche entera Zum naranja
Temperaturas ensayadas	En Pruebas de suspensión : 20 °C	6 °C 20 °C	6 °C 20 °C	6 °C 20 °C	6 °C 20 °C

## 2. VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL DESINFECTANTE

En el experimento 1 se evaluó la eficacia bactericida como reducción decimal (DR) de una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno (PAHP) contra cepas patógenas y no patógenas de *Staphylococcus*, *Listeria* y *Escherichia coli* en presencia de leche, zumo, huevo líquido y chocolate actuado como interferentes. El propósito del empleo de diferentes tipos de materias orgánicas fue simular las condiciones de interferencia a los desinfectantes encontradas en la industria alimentaria. Además se evaluó la eficacia bactericida a diferentes tiempos de exposición y concentración de desinfectante con la intención de encontrar las condiciones óptimas de aplicación del producto. Para tal fin se utilizó una prueba de suspensión descrita en la norma Europea UNE-NE-1276 (Anónimo, 1998), en la cual se realizaron ajustes referentes principalmente al tipo de materia orgánica utilizada como solución interferente. Además, se desarrolló un procedimiento de limpieza y desinfección utilizando este desinfectante ajustado a las características y condiciones de la máquina de UHPH.

### 2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Listeria monocytogenes* Scott A, fueron obtenidas en viales liofilizados refrigerados de la Colección Española de Cultivos Tipos (Universidad de Valencia, Valencia, España). Los viales fueron mantenidos en refrigeración a 4 °C antes de su uso. El vial con el cultivo liofilizado fue rehidratado en caldo triptona soja (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) a 37 °C por 18 h. Seguidamente estos caldos fueron utilizados para inocular placas de agar triptona soja (Oxoid) a partir de las cuales fueron seleccionadas colonias individuales para preparar los crioviales (Nalgene® System 100™ Laboratorios Microkit Iberica S.L., Madrid,

España) de cada una de las cepas que fueron mantenidas en congelación a -20 °C para mantener el stock de cultivos durante los ensayos.

## **2.2. Preparación de las suspensiones bacterianas de ensayo**

Previo cada experimento, una perla del criovial conteniendo el microorganismo a ensayar fue inoculada en 10 mL de caldo triptona soja (Oxoid Ltd) y se incubó a 37 °C por 20 h. A continuación estos caldos fueron sembrados en tubos de agar inclinado triptona soja (Oxoid) e incubados a 37 °C por 20 a 24 h. A continuación a partir de estos tubos se preparó una suspensión de células siguiendo las indicaciones de la normativa Europea UNE-NE-1276 (Anónimo, 1998). Las células fueron suspendidas en una solución de cloruro de sodio triptona (CST) (1 g de triptona y 8.5 de cloruro de sodio por Litro) y seguidamente fue determinada la concentración de células por absorbancia óptica a 405 nm usando un espectrofotómetro (Cecil 9000 series, Cecil instruments, Cambridge, Inglaterra) hasta tener una concentración de 9.0 log<sub>10</sub> UFC/ml a 9.3 log<sub>10</sub> UFC/ml para cada cepa. Posteriormente esta solución de células fue empleada para preparar diluciones en CST que fueron usadas para validar la prueba y probar el desinfectante. Para determinar el número inicial de células, 1 mL de la dilución de suspensión de células se puso en placas de agar triptona soja (Oxoid) que se incubaron a 37 °C por 48 h para luego realizar el respectivo conteo.

## **2.3. Preparación de la solución desinfectante**

El desinfectante usado en este estudio fue una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno PAHP (Oxonia Active®, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, España). Este es un producto concentrado disponible comercialmente para el uso en la industria de los alimentos. Se prepararon soluciones a las concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 % (v/v) utilizando agua con una dureza de 600 mg/l (A: 19,84 MgCl<sub>2</sub> + 46,24 CaCl<sub>2</sub> g/l B: 35,02 NaHCO<sub>3</sub> g/l; 6 mL solución A + 8 mL



solución B por litro). A continuación, estas soluciones fueron utilizadas inmediatamente en cada experimento.

#### **2.4. Preparación de las sustancias interferentes**

Se prepararon cuatro sustancias interferentes utilizando leche semi-desnatada, zumo de naranja, huevo líquido y batido de chocolate estériles diluidas con agua destilada hasta obtener una concentración final del 1,0 % (v/v) de acuerdo a la norma Europea UNE-NE-1276 (Anónimo, 1998). Una vez preparadas, fueron esterilizadas a 121 °C por 15 minutos y seguidamente colocadas en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

#### **2.5. Experimentos para determinar la actividad bactericida**

La suspensión de células fue preparada como se indicó anteriormente. Los experimentos para determinar la actividad bactericida por acción del desinfectante fueron desarrollados de acuerdo a la norma UNE-NE-1276 fase 2 (Anónimo, 1998). En resumen: 1 mL de suspensión de células y 1 mL de la sustancia interferente fueron adicionados a 8 mL de solución desinfectante mantenida a 20 °C. Seguidamente 1 mL de la mezcla anterior fue neutralizada en 9 mL de la solución neutralizante (8 mL de neutralizante y 1 mL de agua destilada estéril) a los 10, 20 y 30 minutos de tiempo de exposición. Para determinar el número final de células después del tiempo de exposición, 1 mL de la mezcla fue inoculada en placas de agar triptona soja (Oxoid Ltd) e incubadas a 37 °C. Para todos los microorganismos estudiados las colonias fueron contadas después de 48 h de incubación. Para el PAHP, el neutralizante consistió de 10 mL de 34 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solución tampón ajustado a pH 7.2 con NaOH, 3 g de lecitina, 30 mL de Tween 80, 5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y 1 g de L-histidina por litro. La solución neutralizante fue colocada dentro de los tubos de prueba (8 mL) y autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

## **2.6. Efectividad desinfectante**

La efectividad del desinfectante expresado como eficacia bactericida o reducción decimal (DR) fue determinada por la formula:  $DR = \log N_i - \log N_f$ . Donde  $N_i$  es la suspensión inicial de células diluidas dos veces expresado como numero de UFC/mL y  $N_f$  es el número de UFC/mL en placas de agar triptona soja (Oxoid Ltd) después del tiempo de exposición al desinfectante. El desinfectante fue considerado efectivo si la DR fue mayor de 5 unidades logarítmicas después del tiempo de contacto establecido (10, 20 y 30 minutos).

## **2.7. Tratamiento estadístico de los datos de las pruebas de suspensión**

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos presentados como medias por cuadrados mínimos de cada experimento. Un análisis de varianza-covarianza fue desarrollado usando el procedimiento lineal generalizado (GLM) del sistema de análisis estadístico SAS® (SAS, 1999), donde el logaritmo de la carga inicial fue utilizado como covariable. El modelo consideró como variables independientes la cepa bacteriana, tipo de sustancia interferente, tiempo de exposición y concentración de desinfectante, y como variable dependiente el logaritmo de la reducción decimal. Las evaluaciones se basaron en un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . Las diferencias significativas entre las medias fueron determinadas usando medias por cuadrados mínimos (LSmeas).

## **2.8. Condiciones de limpieza y desinfección ensayadas en la máquina de UHPH**

Se establecieron como condiciones iniciales que la circulación del agua y los productos de limpieza y desinfección se realizarán sin aplicar presión en el circuito de la máquina de UHPH. Para alcanzar el objetivo de ajustar un proceso de limpieza y desinfección adaptado a las características particulares de la máquina de UHPH se

ensayaron diferentes condiciones de aplicación del PAHP sobre la máquina variando condiciones de concentración del producto, temperatura del agua de aclarado, temperatura del agua de dilución del desinfectante y del jabón y tiempo de exposición al desinfectante. Además se estableció que para la limpieza del equipo se debería utilizar siempre agua destilada estéril para evitar el depósito de residuos minerales que pudieran ocasionar acumulos en la superficie de las tuberías y en el sistema de válvulas del equipo que posteriormente interfirieran con el normal proceso de presurización-homogenización y desinfección.

Durante el procedimiento de ajuste del proceso de limpieza y desinfección sobre la máquina se ensayaron concentraciones de desinfectantes desde 0,5 a 2,5 % (v/v) empleando agua destilada estéril con temperaturas máximas de 40 °C y tiempos de exposición al desinfectante entre 20 y 120 minutos. La temperatura del agua de aclarado así como la utilizada para diluir el jabón se incrementó hasta un máximo de 70 °C. El tiempo de aplicación del jabón (Dipol®, Dima S. L., Madrid, España) fue de 20 minutos con una concentración máxima de 5 % (v/v). Todas las combinaciones de las condiciones ensayadas en la presente Tesis Doctoral se resumen en la Tabla 4.

Se estableció que previo al inicio de cualquier proceso de presurización se debe aclarar previamente con agua destilada estéril a temperatura ambiente, con el fin de arrastrar posibles restos de desinfectante, impurezas o células bacterianas que puedan haber quedado en el interior del equipo. Una vez culminado el proceso de presurización de la matriz tratada en el equipo, se debe limpiar y desinfectar inmediatamente para evitar la formación de *biofilms* y depósitos de materia orgánica con la posterior multiplicación de los microorganismos en el interior del homogeneizador de UHPH.

**Tabla 4.** Condiciones generales ensayadas en el proceso de limpieza y desinfección del equipo UHPH.

PAHP % (v/v)	T° Agua dilución PAHP (°C)	Exposición PAHP (minutos)	T° agua aclarado (°C)	Jabón % (v/v)	T° Agua dilución jabón (°C)
0,5	TA	20	TA	2,5	TA
0,5	TA	40	TA	2,5	TA
1,0	TA	40	TA	2,5	TA
1,0	TA	60	TA	2,5	TA
1,5	TA	60	TA	2,5	TA
1,5	TA	90	TA	2,5	TA
2,0	40	90	70	2,5	70
2,0	40	120	70	5,0	70
2,5	40	90	70	5,0	70
2,5	40	120	70	5,0	70

TA: Agua a temperatura ambiente

## 2.9. Procedimiento de limpieza y desinfección aplicado a la máquina de UHPH

Ensayadas todas las combinaciones de tratamiento y habiendo establecido las condiciones óptimas de limpieza y desinfección el procedimiento de saneamiento aplicado fue el siguiente: (i) aclarado con agua destilada estéril a 70 °C hasta obtener un agua de salida del equipo clara y transparente sin restos aparentes de materia orgánica. (ii) circulación de una solución jabonosa neutra al 5% (v/v) descartando la mitad del volumen inicial y recirculando el resto por 20 minutos. (iii) aclarado con agua destilada estéril a 70 °C hasta obtener un agua de salida del homogeneizador sin restos aparentes de jabón. (iv) desinfección por 120 minutos con una solución al 2,5 % (v/v) de PAHP preparado usando agua destilada estéril a 40 °C. (v) aclarado con agua destilada estéril a temperatura ambiente. Finalmente para comprobar y controlar la eficacia del procedimiento de limpieza y desinfección de la máquina fue colectado 1,4 litros del agua en 2 botellas estériles (700 mL en cada botella) de la parte final del

último aclarado. Seguidamente cada botella de agua fue filtrada a través de un filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore S.A., Molsheim, Francia), y sembrado sobre una placa de TSAYE (Oxoid) y incubado a 37 °C por 48 h.

### **3. EVALUACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS USANDO TRATAMIENTOS DE UHPH**

#### **3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento**

*Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 y *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 fueron obtenidas en viales liofilizados refrigerados de la Colección Española de Cultivos Tipos (Universidad de Valencia, Valencia, España). Los viales fueron mantenidos en refrigeración a 4 °C antes de su uso. El vial con el cultivo liofilizado fue rehidratado en caldo triptona soja (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) a 37 °C por 18 h. Seguidamente estos caldos fueron utilizados para inocular placas de agar triptona soja (Oxoid) a partir de las cuales fueron seleccionadas colonias individuales para preparar los crioviales (Nalgene® System 100™ Laboratorios Microkit Iberica S.L., Madrid, España) de cada una de las cepas que fueron mantenidas en congelación a -20 °C para mantener el stock de cultivos durante los ensayos.

#### **3.2. Preparación de la suspensión de células e inoculación de leche y zumo de naranja**

Previo cada experimento una perla del criovial conteniendo el microorganismo a ensayar fue inoculada en 10 mL de caldo triptona soja (Oxoid Ltd) e incubado a 37 °C por 20 h. Seguidamente estos caldos fueron sembrados en tubos de agar inclinado triptona soja (Oxoid Ltd) e incubados a 37 °C por 20 a 24 h. A partir de las colonias en

los tubos de agar inclinado se preparo 11 mL de una suspensión de células en cloruro de sodio triptona (CST) (1 g de triptona digestión pancreática de caseína y 8.5 de cloruro de sodio por Litro). Seguidamente 1 mL de la suspensión fue usada para determinar la concentración de la suspensión de células por absorbancia óptica a 405 nm usando un espectrofotómetro (Cecil 9000 series, Cecil instruments, Cambridge, Inglaterra) hasta tener una concentración de  $9.0 \log_{10} \text{UFC/ml}^{-1}$  a  $9.5 \log_{10} \text{UFC/ml}^{-1}$  para cada cepa en cada uno de los ensayos. Finalmente 10 mL de esta suspensión fueron inoculados en un litro de leche y zumo de naranja UHT a temperatura ambiente. La concentración final de células en la leche y en el zumo de naranja fue de  $7.0 \log_{10} \text{CFU/ml}$  a  $7.5 \log_{10} \text{CFU/ml}$ . Las muestras inoculadas de las leches y el zumo de naranja fueron puestas por 70 minutos a 6 y 20 °C en un baño de agua para alcanzar las temperaturas de presurización. Previo a realizar la inoculación de las muestras de leche y zumo se tomo una muestra de 10 mL en tubos estériles para comprobar la esterilidad de la matriz usada en los ensayos.

### **3.3. Tratamientos por UHPH de muestras inoculas de leche y zumo de naranja**

Todos los tratamientos de UHPH aplicados a las muestras de leche y zumo de naranja fueron realizados usando un homogeneizador de alta presión *Stansted* (modelo/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra) (Figura 4). Esta máquina de UHPH esta conformada por una válvula de alta presión fabricada de un material cerámico resistente, el cual es capaz de soportar 400 MPa de presión. También contiene una segunda válvula neumática capaz de soportar 50 MPa de presión, localizada a continuación de la primera válvula (Figura 5). El sistema de alta presión consiste de dos intensificadores (80 mL de capacidad), conectados con una bomba hidráulica (Figura 4), que permite que la tasa de fluido de la leche y el zumo de naranja en el homogeneizador sea constante ( $18 \text{ L h}^{-1}$ ). Para evitar el bajo rendimiento del homogeneizador debido al aumento de la temperatura y expansiones o contracciones rápidas en la primera válvula, esta última fue enfriada por circulación

constante de agua a temperatura ambiente a través de una chaqueta externa construida alrededor de la válvula (Figura 5). Todas las muestras de leche y zumo de naranja fueron sometidas a un único pase en el homogeneizador de UHPH a 300 + 30 MPa (300 MPa en la primera válvula de homogenización y 30 en la segunda válvula) a las temperaturas de entrada de 6 y 20 °C. Para cada uno de los ensayos fueron usados 2,0 litros de la matriz inoculada (leche entera, leche desnatada ó zumo de naranja) de los cuales la mayor parte del volumen se presurizo para alcanzar la temperatura de equilibrio y la presión en cada tratamiento. Después, al final del procedimiento de presurización, fueron tomados entre 80 y 100 mL de la muestras para el análisis. Las muestras homogenizadas fueron rápidamente refrigeradas hasta alcanzar una temperatura de salida del homogeneizador de 16 a 18 °C por medio de una chaqueta externa construida alrededor de la tubería localizada entre la primera y segunda válvula de la máquina de UHPH (Figura 5) y un espiral tipo intercambiador de calor (BCI/2843 type, Occo Cooler Ltd., Telford, Inglaterra) localizado inmediatamente después de la segunda válvula (Figura 4). Las muestras para el análisis fueron refrigeradas a 4 °C hasta su procesamiento. Una vez culminada la presurización de las muestras, se realizó el procedimiento de limpieza y desinfección de la máquina de UHPH empleando el procedimiento descrito previamente en la sección 2.9 de este capítulo.

### 3.4. Análisis microbiológico

Para determinar el recuento inicial de células en muestras inoculadas de leche y zumo de naranja colocadas previo a su tratamiento a 6 y 20 °C, se uso 1 mL de cada muestra a partir del cual se prepararon diluciones decimales en agua de peptona (Oxoid, 10 g/L peptona y 5 g/L NaCl). Seguidamente, 1 mL de estas diluciones fueron sembradas por duplicado en placas de agar triptona soja (Oxoid) suplementado con 6 g/L de extracto de levadura (Oxoid, TSAYE) e incubadas a 37 °C por 48 h. Adicionalmente, en los experimentos donde se utilizo zumo de naranja como matriz la

muestra fue sembrada por duplicado en placas de TSAYE suplementadas con 60, 30, y 20 g/L de NaCl (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, España; TSAYE + NaCl) para los géneros *Staphylococcus*, *Listeria* y *Escherichia*, respectivamente (Patterson y Kilpatrick, 1998; Patterson y col., 1995). Esta siembra paralela en ambos medios para el recuento inicial en una matriz estresante como el zumo de naranja sin presurizar se realizó con el fin de poder establecer el posible daño causado en los microorganismos por el bajo pH. Además, fueron colocados en tubos estériles 20 mL de muestra inoculada sin tratar y almacenada a 4 °C. Estas muestras, para los efectos de los ensayos, fueron denominadas como controles no presurizados y fueron incluidas en los análisis microbiológicos para determinar el número de células al inicio y durante la duración de cada experimento.

El análisis microbiológico de todas las muestras presurizadas fue desarrollado 2 h después de los tratamientos. En todos los experimentos con leche entera, leche desnatada y zumo de naranja las muestras presurizadas fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis y durante los días de duración del experimento. Las muestras de leche entera y desnatada adicionalmente se analizaron en los días 3, 6 y 9 posteriores al tratamiento, mientras que en zumo de naranja se analizaron en los días 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27 y 33 de almacenamiento.

Para los ensayos de letalidad y el nivel de daños subletales causados por el tratamiento de UHPH, se prepararon diluciones decimales de muestras presurizadas y controles (leche y zumo de naranja) y sembraron por duplicado en TSAYE y TSAYE + NaCl e incubaron a 37 °C por 48 h. El plan de trabajo general desarrollado de los análisis de los experimentos para determinar la eficacia de la UHPH para reducir la carga microbiana en matrices fluidas inoculadas con diferentes microorganismos se puede observar en la figura 6.

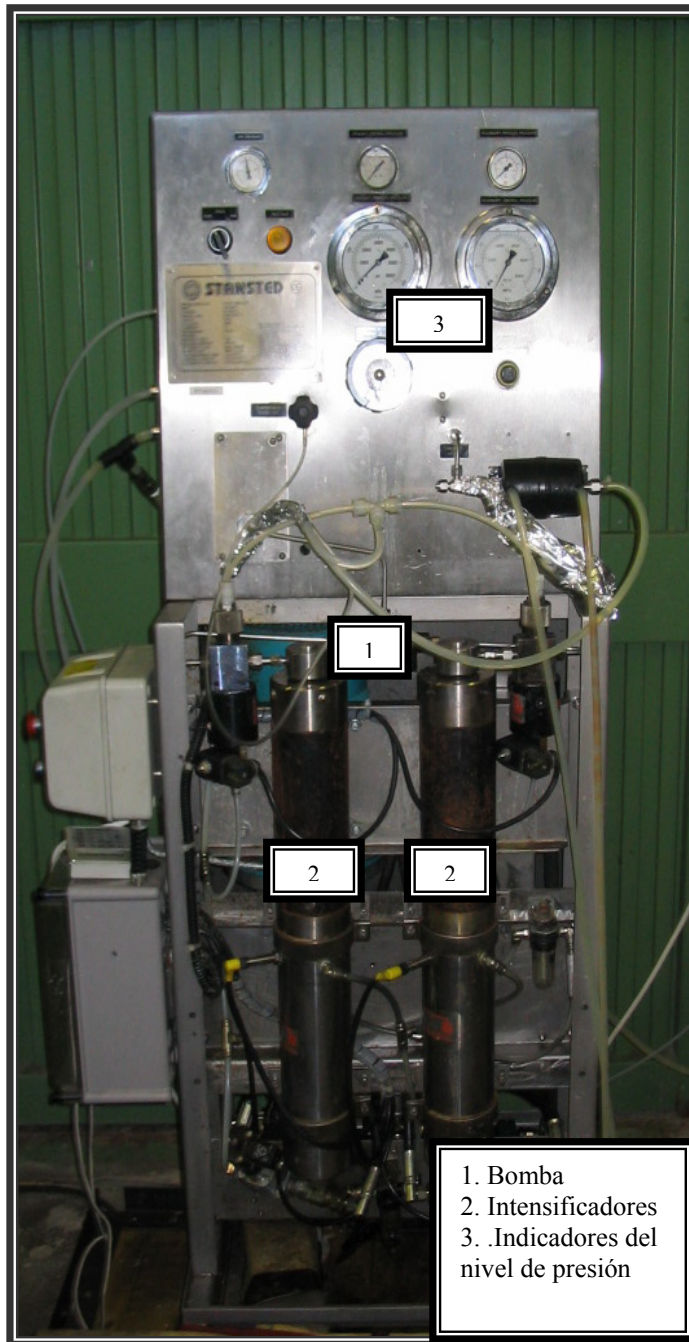
El uso de esta técnica diferencial de siembra, que consiste de una siembra en paralelo de la misma muestra en TSAYE y TSAYE + NaCl nos permite monitorear y determinar si el tratamiento aplicado produce daños subletales en las células. Ambos grupos de células bacterianas dañadas y no dañadas son capaces de formar colonias en



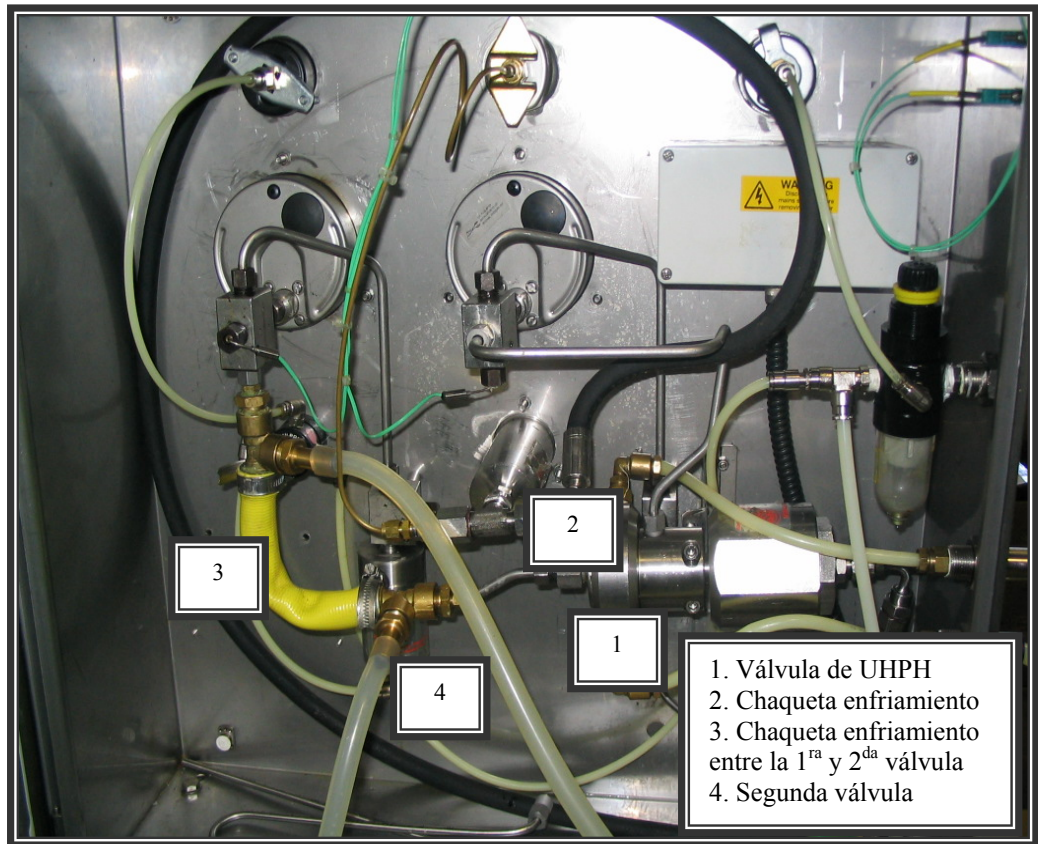
TSAYE mientras que solo las células no dañadas son capaces de formar colonias en presencia de un estresante como NaCl (Patterson y Kilpatrick, 1998; Patterson y col., 1995). La diferencia existente entre los recuentos en TSAYE y TSAYE + NaCl proporciona el número aproximado de células lesionadas por efectos del tratamiento. Los resultados fueron expresados como logaritmos de UFC/mL. La letalidad fue calculada como la diferencia existente entre el logaritmo del recuento de colonias de muestras no tratadas o controles y las muestras presurizadas ( $\log N_0 - \log N$ ).

### 3.5. Tratamiento estadístico de los datos

Todos los experimentos fueron repetidos cuatro veces, con duplicado de análisis en cada réplica. Los datos son presentados como medias por cuadrados mínimos de cada experimento. Un análisis de varianza fue desarrollado usando el procedimiento lineal generalizado (GLM) del sistema de análisis estadístico SAS® (SAS, 1999). El modelo consideró como variables independientes la cepa bacteriana, tipo de matriz, nivel de temperatura y tipo de medio, y como variable dependiente el logaritmo de la letalidad o el logaritmo de los recuentos en los días posteriores al tratamiento según el caso. Las evaluaciones se basaron en un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .



**Figura 4:** Parte externa del homogeneizador de ultra alta presión *Stansted model/DRG FPG7400H:350*



**Figura 5:** Parte interna del homogeneizador de ultra alta presión *Stansted model/DRG FPG7400H:350*

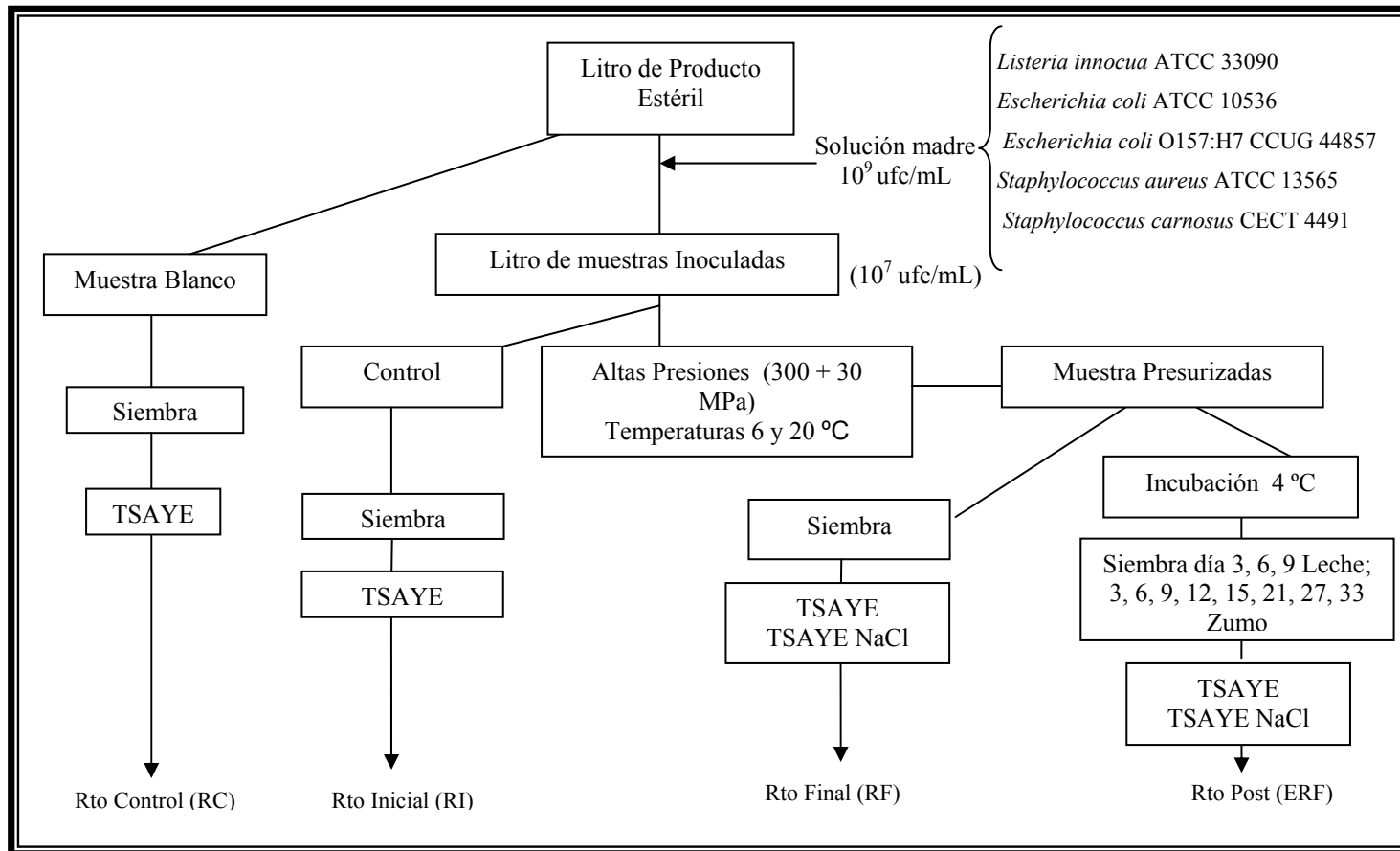


Figura 6: Plan de trabajo general de los ensayos de UHPH.

#### 4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anónimo. (1998). Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - test method and requirement (phase 2 step 1). UNE-EN-1276., 1-35.

Statistical Analysis Systems Institute, SAS. (1999) User's Guide. Version 8. Institute Inc.; Cary, NC: U.S.A.

Patterson, M. F., y Kilpatrick, D.J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61(4), 432-436.

Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R., y Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58(5), 524-529.

CAPÍTULO  
CUARTO

---

**Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli***

**Eficacia Bactericida del ácido peracético en combinación con el peróxido de hidrógeno contra cepas patógenas y no patógenas de *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. y *Escherichia coli***

Food Control 17, (2006) 516-521.

# Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*

Wilfido José Briñez, Artur X. Roig-Sagués\*, M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero, Tomas López-Pedemonte, Buenaventura Guamis

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERTA), XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

Received 16 October 2004; received in revised form 21 February 2005; accepted 22 February 2005

## Abstract

The aim of this research was to evaluate the bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide (PAHP) against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. Killing experiments were performed according to the European standard suspension test UNE-EN-1276. The PAHP was tested at five concentrations from 0.05% to 0.4% v/v and three exposure times (10, 20 and 30 min) using sterile semi-skim milk, orange juice, liquid egg and chocolate milk shake as interfering substances. *Staphylococcus* spp. showed more resistance at low concentrations of disinfectant than strains of *E. coli* and *Listeria* spp. Egg was the organic matter with greatest interfering capacity and orange juice was the one with least interfering capacity. However PAHP was effective (reductions of >5 log CFU/ml) at concentrations from 0.1% and 10 min of exposure in all cases. No statistical differences were found between pathogenic and non pathogenic strains in the same group. Consequently, when the utilization of pathogenic strains is not possible, they may be substituted by non pathogenic strains of the same group, obtaining similar reductions.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Bactericidal efficacy; Peracetic acid; Hydrogen peroxide; *Escherichia coli*

## 1. Introduction

Over the last years, foodborne diseases caused millions of illnesses worldwide (Dontrou et al., 2003; Orden et al., 2002; Todd, 1992). One way in which food can be contaminated with pathogens is by contacting contaminated food-processing equipment. Therefore, it is of the utmost importance to clean and disinfect these equipments regularly and sufficiently (Luppens, Reij, Van der Heijden, Rombouts, & Abee, 2002; Taormina

& Beuchat, 2002). Thus an effective disinfectant should be used, and an appropriate concentration of this disinfectant should be applied in the factory in order to avoid propagation of foodborne diseases. Usually an effective cleaning and sanitation step is a part of a program to inactivate microorganisms, preventing the accumulation of microbial cells and particulates on the surfaces of equipment as well as biofilm formation (Peng, Tsai, & Chou, 2002).

A broad spectrum of microbial pathogens can contaminate human food and cause illnesses after they or their toxins are consumed (Griffin & Tauxe, 1991; Tauxe, 2002). *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 has been recognized as

\* Corresponding author. Tel.: +34 935811460; fax: +34 935812006/1494.

E-mail address: [arturxavier.roig@uab.es](mailto:arturxavier.roig@uab.es) (A.X. Roig-Sagués).

widespread foodborne pathogens that may cause serious illness and death in risk populations (Tauxe, 2002; Tarté, Murano, & Olson, 1996).

In the processes of cleaning and disinfection of food industry a concentration that is too low increases the risk of acquisition of resistance to the disinfectant, and a concentration that is too high increases the cost and the environmental burden (Luppens et al., 2002). In order to apply a suitable disinfectant it should be tested against different microbial strains and representative working conditions of the food industry. The established procedure for testing disinfectants in Europe consists of three phases. In the first phase the basic activity of the product is tested with a suspension test. In phase 2 the disinfectant product is tested with a suspension test under conditions that are representative of practical conditions and the third phase consists of field tests under actual working conditions of the food industry (Anonymous, 1997; Anonymous, 1998).

At the moment, the evaluation of disinfectants in phase 3 represents a great difficulty due to European regulation UNE-EN-1276 (Anonymous, 1998), which demands the use of pathogenic microorganisms. However, the European Union regulations restrict the use of pathogenic microorganisms to laboratories under strictly controlled working conditions, which are difficult to achieve in food processing plants (Anonymous, 1990). This is the reason why it is more and more important the search for surrogates, non-pathogenic microorganisms which show similar resistance to disinfectants and allow us to make field tests under real industrial conditions. In this way it would be possible to comply with present regulations (Anonymous, 1998) without failing to fulfil with the European restrictions in the use of pathogenic microorganisms in food plants (Anonymous, 1990).

A broad spectrum of disinfectant agents with different activity and action types against food pathogens is available (Lundén, Autio, Markkula, Hellström, & Korkeala, 2003). A disinfectant product that is currently attracting particular interest is a mixture of hydrogen peroxide and peracetic acid, since its components are not considered particularly harmful for the ecosystem. Furthermore, it does not produce toxic compounds or react with organic matter (Rossoni & Gaylarde, 2002). The mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide (PAHP) is considered a strong oxidizing agent effective against bacteria, yeasts, fungal and bacterial spores (Fatemi & Frank, 1999) and it has been widely employed by the food and beverage industry.

Information on these formulations as a bactericidal agent is limited in the literature and more studies of its bactericidal capacity at different concentrations, exposure times and presence of organic matters are required. The aim of this research was to evaluate the bactericidal efficacy as decimal reduction (DR) of PAHP against

strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* in different organic matter types, exposure times and disinfectant concentrations. Also, we intended to study the resistance of pathogenic and non pathogenic strains of these groups of microorganisms in order to find valid surrogates to be used in the field evaluation of disinfectants under European regulations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains used and growth conditions

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Sa), *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 (Sc), *Escherichia coli* ATCC 10536 (Ec), *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 (Ec157), *Listeria innocua* ATCC 33090 (Li) and *Listeria monocytogenes* Scott A (Lm), were obtained as freeze-dried cultures in thermosealed vials from the Spanish Type Culture Collection (University of Valencia, Valencia Spain). Freeze-dried cultures were rehydrated in tryptone soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) at 37 °C for 18 h. Subsequently, these broths were used to inoculate tryptone soy agar plate (Oxoid Ltd.) and individual colonies were collected to prepare cryogenic vials (Nalgene® System 100™ Laboratories Microkit Iberica S.L., Madrid, Spain) of each strain. They were then kept at –20 °C to provide stock cultures for the assays.

### 2.2. Bacterial suspension preparation

Prior to each experiment one pearl of a cryogenic vial was inoculated in 10 ml of tryptone soy broth (Oxoid Ltd) and incubated at 37 °C for 20 h. After incubation, the broth was spread on a tryptone soy agar tube (Oxoid Ltd) at 37 °C for 20–24 h. Subsequently, cell suspensions were prepared following instructions of the European regulation UNE-NE-1276 (Anonymous, 1998). Cells were suspended in tryptone sodium chloride solution (TSC) (1 g of tryptone pancreatic casein digestion and 8.5 g sodium chloride per litre) in order to obtain  $1.0 \times 10^9$  to  $3.0 \times 10^9$  CFU/ml. Concentration was determined by optical absorbance at 405 nm (405 OA<sub>405</sub>). Later, this cell suspension was used to prepare dilutions (from  $1.0 \times 10^1$  to  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml) in TSC which afterwards were used to validate the assay and to test the disinfectant agent. To determine the initial number of cells, 1 ml of each suspension was spread on tryptone soy agar plate (Oxoid Ltd.) and incubated at 37 °C for 48 h.

### 2.3. Disinfectant solution and preparation

The disinfectant agent used in this study was a commercially available mixture of peracetic acid and



hydrogen peroxide PAHP (Oxonia Active, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, Spain) a product intended for use in the food industry. Disinfectant solutions at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4% (v/v) were made using synthetic sterile hard water of 600 mg/l hardness. They were used immediately after preparation.

#### 2.4. Interfering substances

Semi-skim milk, orange juice, liquid egg and chocolate milk shake were used as interfering substances in order to test the influence of organic matter on the efficacy of the disinfectant and to simulate the practical conditions of the food industry. 1.0% (v/v) solutions of these interfering substances were prepared according to the standard UNE-EN-1276 (Anonymous, 1998). Subsequently they were sterilised 15 min at 121 °C and cooled to 4 °C.

#### 2.5. Killing experiments

Cell suspensions were prepared as described above. Killing experiments were performed according to European standard UNE-NE-1276 phase 2 (Anonymous, 1998). Briefly, 1 ml of cell suspension and 1 ml of interfering solution were added to 8 ml disinfectant solution maintained at 20 °C. Subsequently, after 10, 20 and 30 min of exposure time, 1 ml of this mixture was mixed with 1 ml of sterile distilled water and 8 ml of sterile neutralizer (10 ml of a 34 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer adjusted to pH 7.2 with NaOH, 3 g lecithin from soy beans, 30 ml of Tween 80, 5 g of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  and 1 g of L-histidine per litre). To determine the final number of viable cells after the exposure time, 1 ml of the mixture was spread onto a tryptone soy agar plate (TSA, Oxoid Ltd.) and incubated at 37 °C. Colonies were counted after 48 h.

The effectiveness of the disinfectant agent expressed as germicidal effect or decimal reduction (DR), was determined by the formula:  $\text{DR} = \log N_i - \log N_f$  where  $N_i$  is two-fold dilute initial cells suspension count (CFU/ml) in TSA and  $N_f$  is the count on TSA after exposure to disinfectant. The disinfectant was considered effective if a DR of at least 5  $\log_{10}$  units was observed after the established contact time.

#### 2.6. Statistical treatment of data

All experiments were done by triplicate and data are presented as least square means of each experiment. An analysis of variance–covariance was performed using the General Lineal Models Procedure of SAS® System (Statistical Analysis Systems Institute, 1999), where the logarithm of the initial bacterial load was used as covariable. Evaluation was based at a level of significance of  $P < 0.05$ . Significant differences between means were determined using least square means (LSmeans).

### 3. Results and discussion

Several factors are known to influence the activity of the active ingredients in biocides (term that includes antiseptics, disinfectants and preserving products). These include the period of contact with the selected micro-organism, the presence of interfering materials (e.g., organic or inorganic soils), formulation effects, temperature of contact and the nature and type of target micro-organisms (Holah, 1995).

The effect of the type of organic matter, exposure time and concentration of PAHP in DR for each group of microorganisms tested in our work is showed in Tables 1–3. The effectiveness of the disinfectant against the different microorganisms depended on the concentration. DR values for concentrations of 0.3 and 0.4%

Table 1

Effect of organic matter type, exposure time and concentration of PAHP in decimal reduction of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491

Microorganism	Organic matter	Concentration PAHP (% v/v) and exposure time (min) (Least square means decimal reduction $\log_{10}$ CFU/ml)														
		0.05			0.1			0.2			0.3			0.4		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Milk	6.15 <sup>a</sup>	6.27	5.36 <sup>b</sup>	6.30 <sup>a</sup>	6.27	5.87	6.22 <sup>a</sup>	6.23	6.22 <sup>a</sup>	6.45	6.30	6.10 <sup>a</sup>	5.77 <sup>b</sup>	6.45 <sup>a</sup>	6.30
	Chocolate	6.44 <sup>a</sup>	6.44	5.67 <sup>a</sup>	6.44 <sup>a</sup>	5.77	6.44	6.33 <sup>a</sup>	6.28	6.25 <sup>a</sup>	6.34	6.27	6.27 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a</sup>	6.40 <sup>a</sup>	6.35
	Egg	4.67 <sup>b</sup>	5.76	5.30 <sup>b</sup>	5.30 <sup>b</sup>	5.98	5.76	5.53 <sup>b</sup>	6.07	5.73 <sup>b</sup>	5.98	6.11	5.50 <sup>b</sup>	5.98 <sup>a</sup>	5.89 <sup>b</sup>	5.96
	Juice	4.94 <sup>b</sup>	5.96	6.39 <sup>a</sup>	6.14 <sup>a</sup>	5.89	6.15	6.54 <sup>a</sup>	6.44	6.45 <sup>a</sup>	6.45	6.54	6.60 <sup>a</sup>	6.69 <sup>a</sup>	6.84 <sup>a</sup>	6.75
<i>Staphylococcus carnosus</i> (CECT 4491)	Milk	5.85 <sup>a</sup>	5.44	5.58 <sup>a</sup>	6.00	6.00	5.85 <sup>b</sup>	5.93	5.71	5.76	6.02	5.71	6.02	6.02	6.02	6.02
	Chocolate	4.77 <sup>b</sup>	5.47	5.66 <sup>a</sup>	5.32	5.32	6.77 <sup>a</sup>	5.72	5.73	5.54	5.88	5.73	6.03	5.79	5.88	6.03
	Egg	4.22 <sup>b</sup>	5.09	4.56 <sup>b</sup>	5.56	5.54	5.14 <sup>b</sup>	5.49	5.79	5.58	6.00	6.00	5.86	5.86	5.77	6.00
	Juice	5.61 <sup>a</sup>	5.61	5.76 <sup>a</sup>	5.85	5.85	5.61 <sup>b</sup>	5.66	5.80	5.88	6.00	6.00	6.00	5.85	6.00	6.00

<sup>a,b</sup> Means (decimal reduction  $\log_{10}$  CFU/ml) in columns for each microorganism are significantly different if followed by different letters ( $P \leq 0.05$ );  $n = 3$  for all data.

Table 2

Effect of organic matter type, exposure time and concentration of PAHP in decimal reduction of *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 and *Escherichia coli* ATCC 10536

Microorganism	Organic matter	Concentration PAHP (% v/v) and exposure time (min) (Least square means decimal reduction log <sub>10</sub> CFU/ml)														
		0.05			0.1			0.2			0.3			0.4		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (CCUG 44857)	Milk	6.32 <sup>a</sup>	6.08	6.17 <sup>a</sup>	6.32	6.17 <sup>a</sup>	6.32 <sup>a</sup>	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31
	Chocolate	6.31 <sup>a</sup>	6.16	5.51 <sup>b</sup>	6.31	6.07 <sup>b</sup>	6.06 <sup>b</sup>	6.23	6.15	6.15	6.30	6.30	6.30	6.30	6.15	6.30
	Egg	6.00 <sup>b</sup>	6.15	6.30 <sup>a</sup>	6.15	6.30 <sup>a</sup>	6.30 <sup>a</sup>	6.31	6.31	6.31	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32
	Juice	6.31 <sup>a</sup>	6.31	6.31 <sup>a</sup>	6.31	6.31 <sup>a</sup>	6.31 <sup>a</sup>	6.22	6.22	6.22	6.13	6.28	6.28	6.28	6.28	6.28
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	Milk	5.33 <sup>b</sup>	6.23	6.23	6.23 <sup>a</sup>	6.23	6.23	6.23	6.23	6.15	6.23	6.23	6.23	6.23	6.23	6.23
	Chocolate	5.24 <sup>b</sup>	6.26	6.10	6.26 <sup>a</sup>	6.26	6.25	6.16	6.09	6.16	6.22	5.99	6.22	6.22	6.22	6.07
	Egg	5.28 <sup>b</sup>	6.11	6.11	5.66 <sup>b</sup>	6.02	6.11	6.26	6.26	6.26	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
	Juice	5.92 <sup>a</sup>	6.22	6.22	6.22 <sup>a</sup>	6.22	6.22	6.14	6.14	6.14	6.20	6.05	6.05	6.20	6.20	5.96

<sup>a,b</sup> Means (decimal reduction log<sub>10</sub>CFU/ml) in columns for each microorganism are significantly different if followed by different letters ( $P \leq 0.05$ );  $n = 3$  for all data.

Table 3

Effect of organic matter type, exposure time and concentration of PAHP in decimal reduction of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Listeria innocua* ATCC 33090

Microorganism	Organic matter	Concentration PAHP (% v/v) and exposure time (min) (Least square means decimal reduction log <sub>10</sub> CFU/ml)														
		0.05			0.1			0.2			0.3			0.4		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Milk	6.03 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a</sup>	6.18	6.18	6.33	6.33	6.34	6.34	6.34	6.36	6.36	6.36	6.21	6.36	6.36
	Chocolate	5.29 <sup>b</sup>	5.62 <sup>b</sup>	6.25	5.93	6.19	6.25	6.27	6.19	6.09	6.37	6.37	6.37	6.37	6.37	6.37
	Egg	6.11 <sup>a</sup>	6.04 <sup>a</sup>	6.34	6.19	6.34	6.34	6.37	6.29	6.29	6.39	6.39	6.39	6.39	6.39	6.39
	Juice	5.57 <sup>b</sup>	6.11 <sup>a</sup>	5.92	6.31	6.31	6.31	6.32	6.21	6.32	6.34	6.34	6.34	6.34	6.34	6.34
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	Milk	6.32 <sup>a</sup>	6.32	6.32	5.72 <sup>b</sup>	6.32	6.08	6.32	6.09	6.32 <sup>a</sup>	6.32	6.32	6.32	6.31	6.32	6.32
	Chocolate	5.84 <sup>b</sup>	6.32	6.32	6.08 <sup>a</sup>	6.32	6.32	6.13	6.17	5.99 <sup>b</sup>	6.09	6.32	6.02	5.93	6.32	6.17
	Egg	5.82 <sup>b</sup>	6.32	6.32	6.32 <sup>a</sup>	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32 <sup>a</sup>	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32
	Juice	6.31 <sup>a</sup>	6.31	6.31	6.31 <sup>a</sup>	6.31	6.31	6.31	6.31	6.10 <sup>a</sup>	6.16	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32

<sup>a,b</sup> Means (decimal reduction log<sub>10</sub> CFU/ml) in columns for each microorganism are significantly different if followed by different letters ( $P \leq 0.05$ );  $n = 3$  for all data.

(v/v) of PAHP were significantly higher than those of 0.1 and 0.2% which in his turn were higher than DR of 0.05%. PAHP was able to inactivate more than 5.00 log<sub>10</sub> CFU/ml of all the studied microorganisms at concentrations above 0.1% (v/v). In these cases the type of organic matter did not exert any significant effect in the DR in any of the strains tested.

At the lower concentration of disinfectant (0.05%) and shorter exposure time (10 min) both strains of *Staphylococcus* spp. (Sa and Sc) showed significantly higher resistance than *E. coli* (Ec157 and Ec) and *Listeria* (Li and Lm), evidenced by a significantly lower DR. However, no significant differences were observed between strains of *Listeria* and *E. coli* in DR. When comparing within the same group, no significant differences were observed in DR between pathogenic and no pathogenic strains. *S. carnosus* was the strain that showed the lowest DR value (4.22 log<sub>10</sub>CFU/ml at 0.05% of concentration after 10 min of exposition).

The European standard UNE-EN-1276, proposes that in suspension tests a DR of 5.0 log<sub>10</sub> (CFU/ml) of the initial bacterial load is good enough to consider that a certain disinfectant has a good bactericidal activity (Anonymous, 1998). Taking this into account we realised that PAHP was not effective against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus carnosus* at a 0.05% concentration and 10 min of exposure, but it was always effective against *Listeria* (Li and Lm) and *E. coli* (Ec157 and Ec). Our results agree with some studies (Frank & Chmielewski, 1997; Van de Weyer, Devleeschouwer, & Dony, 1993) that have previously indicated the great resistance of *S. aureus* to the action of different disinfectants based on quaternary ammonium, chlorine, aldehydes, formaldehyde, alcohols and phenols, although the PAHP was not tested by these authors. Other surveys (Park, Hung, & Chung, 2004; Yu, Newman, Archbold, & Hamilton-Kemp, 2001) reported as well, the great sensitivity of *E. coli* O157:H7 and *Listeria* spp.

against several chemical agents, which increases with the disinfectant concentration. Mullerat, Sheldon, and Klapes (1995), indicated that increasing the amount of added disinfectant significantly raised the bactericidal activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* spp. Other researchers (Aarnisalo et al., 2000; Lee & Frank, 1991) also confirmed that reductions of the studied bacteria increased with time of exposure and the disinfectant concentration. In our work we observed a significant increase of bactericidal activity when increasing the amount of added disinfectant until reaching a concentration of 0.3% v/v and 20 min of exposure time.

The presence of organic matter or hard water reduces the effectiveness of disinfectants (Holah, 1995), and this is considered in the disinfectant efficacy tests proposed by the European regulation UNE-EN-1276 (Anonymous, 1998). In our work the bovine albumin recommended as interfering product by the European standard suspension test protocol, was replaced by solutions of 1.0% (v/v) of semi-skim milk, orange juice, liquid egg and chocolate milk shake, to simulate the practical conditions of the food industry. Egg was in most of the cases the type of organic matter which significantly showed the greatest interfering capacity of PAHP activity at low concentrations (0.05%) and short exposure times (10 min). On the contrary, orange juice had the minor interfering capacity. This fact confirms that interference capacity also depends on the nature of the organic matter employed in tests of disinfectant activity.

Nevertheless, none of the tested interfering substances diminished the effectiveness of PAHP, which always turned out to reduce more than 5 log<sub>10</sub> CFU/ml of all studied microorganisms, except for *Staphylococcus* at 0.05% and after 10 min of exposure. No information has been found in previous studies about the use of different types of organic matters to simulate practical conditions of the food industry, and more specifically to study the efficacy of PAHP. A few surveys (Van de Weyer et al., 1993; Mullerat et al., 1995) indicated that increasing the level of added protein reduces significantly the bactericidal activity of the disinfectant. It is believed that disinfectants are absorbed by the soil or either react with it and therefore become inactivated. Thus, in any system containing microbes and soil, two steps of the biocide inactivation shall be considered: the microbial (or intrinsic) quenching and the soil (or extrinsic) quenching (Holah, 1995). In our study liquid egg was the type of organic matter with the greatest interfering capacity on PAHP activity, possibly due to its complexity, provided that this food matrix presents large quantities of proteins and fats. On the contrary, orange juice which contains lower amounts of these compounds had less interfering capacity, resulting in the highest DR. The re-

sults of our investigation justify the use of different types of interfering substances to simulate the practical conditions found in the food industry for the evaluation of the efficacy of disinfectant. In consequence, to assure effectiveness of the applied disinfectant, it is still extremely important to clean in advance, thoroughly and regularly the equipment used for food processing (Luppens et al., 2002; Taormina & Beuchat, 2002).

Phase 3 evaluation of disinfectants within European Union represents a great difficulty due to regulation UNE-EN-1276 (Anonymous, 1998), which demands the use of pathogenic microorganisms. However, the use of pathogenic microorganisms is restricted to laboratories which work under strictly controlled conditions, hardly found in food industry. This fact prevents us from testing bactericidal efficacy of disinfectants in situ (Anonymous, 1990). This is the reason why it is very important to search for surrogates non-pathogenic microorganisms which show similar resistance to disinfectants and allow us to make field tests under real industrial conditions.

When comparing strains within the same group, no significant differences were observed in the DR between pathogenic and non pathogenic strains. This fact indicates that reductions for strains within the same studied groups are similar, but differed between species. Then it might be reasonable to substitute *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* by non pathogenic strains of the same group in the evaluation of disinfectant products, to avoid introducing a pathogenic microorganism in a processing plant that might contaminate the food produced and to reduce the risk of exposing workers to these agents.

The results of the present study allow us to conclude that PAHP is effective against all strains tested at concentrations above 0.1% and exposure times over 10 min for all the organic matters studied. The concentration of PAHP and the exposure time must be increased in function of the type of organic matter utilized in the evaluation of the efficacy of disinfectant products. The non-pathogenic strains *S. carnosus* CECT 4491, *E. coli* ATCC 10536 and *L. innocua* ATCC 33090 can be used to evaluate the bactericidal efficacy of disinfectants replacing *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 and *L. monocytogenes* Scott A obtaining similar results but diminishing the risk of exposure to pathogens in the field evaluation of disinfectants substances.

#### Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support received from the Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia Dels Aliments (CERTA) which permitted to accomplish this research, and the grant given to

Wilfredo José Briñez Zambrano by the Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (FONACIT) of Venezuela.

## References

- Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., et al. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20, 237–250.
- Anonymous (1990). Council Directive 90/679/EEC of 26 November 1990 on the protection of workers from risk related to exposure to biological agents work (seventh individual directive within the meaning of article 16 (1) of directive 89/391/EEC). Official. *Journal of European Union L*, 374(5), 0001–0012.
- Anonymous (1997) Chemical disinfectants and antiseptics—basic bactericidal activity—test method and requirement (phase 1). UNE-EN-1040, pp. 1–30.
- Anonymous (1998) Chemical disinfectants and antiseptics—quantitative suspension test for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas—test method and requirement (phase 2 step 1). UNE-EN-1276, pp. 1–35.
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., et al. (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 273–279.
- Fatemi, P., & Frank, J. F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*, 62, 761–765.
- Frank, J. F., & Chmielewski, R. A. N. (1997). Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *Journal of Food Protection*, 60, 43–47.
- Griffin, P. M., & Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiological Review*, 13, 60–96.
- Holah, J. T. (1995). Progress report on CEN/TC 216/Working group 3: disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration Biodegradation*, 355–365.
- Lee, S. H., & Frank, J. F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection*, 54, 4–7.
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., & Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 265–272.
- Luppens, S. B. I., Reij, M. W., Van der Heijden, R. W. L., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectant. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4194–4200.
- Mullerat, J., Sheldon, B. W., & Klapes, N. A. (1995). Inactivation of *Salmonella* species and other food-borne pathogens with Salmide®, a sodium chlorite-based oxyhalogen disinfectant. *Journal of Food Protection*, 58, 535–540.
- Orden, J. A., Cid, D., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., García, S., Martínez, S., & de la Fuente, R. (2002). Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 29–35.
- Park, H., Hung, Y.-C., & Chung, D. (2004). Effects of chloride and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 13–18.
- Peng, J.-S., Tsai, W.-C., & Chou, C.-C. (2002). Inactivation and removal of bacillus cereus by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 11–18.
- Rossoni, E. M. M., & Gaylarde, C. C. (2002). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 81–85.
- Statistical Analysis Systems Institute, SAS (1999). *User's Guide. Version 8*. Cary, NC: USA: Institute Inc.
- Taormina, P. J., & Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 71–80.
- Tarté, R., Murano, E. A., & Olson, D. G. (1996). Survival and injury of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii* in ground pork following electron beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 59, 596–600.
- Tauxe, R. V. (2002). Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 31–41.
- Todd, E. C. D. (1992). Foodborne disease in Canada—a 10-year summary from 1975 to 1984. *Journal of Food Protection*, 55, 123–132.
- Van de Weyer, A., Devleeschouwer, M. J., & Dony, J. (1993). Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 480–483.
- Yu, K., Newman, M. C., Archbold, D. D., & Hamilton-Kemp, T. R. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry fruit and reduction of population by chemical agents. *Journal of Food Protection*, 64, 1334–1340.

CAPÍTULO  
QUINTO

---

**Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by  
ultrahigh-pressure homogenisation**

**Inactivación de *Listeria innocua* en leche y zumo de naranja por  
ultra alta presión de homogenización**

Journal of Food Protection 69, (2006) 86-92.

# Inactivation of *Listeria innocua* in Milk and Orange Juice by Ultrahigh-Pressure Homogenization

WILFIDO JOSÉ BRIÑEZ, ARTUR X. ROIG-SAGUÉS,\* M. MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO, AND BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

MS 05-112: Received 16 March 2005/Accepted 10 June 2005

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the bactericidal efficacy of ultrahigh-pressure homogenization (UHPH) against *Listeria innocua* ATCC 33090 inoculated into milk and orange juice. We also intended to study the effect of inlet temperature on the lethality and production of sublethal injuries in this microorganism and its ability to survive, repair, and grow in refrigerated storage after UHPH treatment. Samples of ultrahigh-temperature whole milk and ultrahigh-temperature orange juice inoculated at a concentration of approximately 7.0 log (CFU per milliliter) were immediately pressurized at 300 MPa on the primary homogenizing valve and at 30 MPa on the secondary valve, with inlet temperatures of  $6.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  and  $20 \pm 1.0^\circ\text{C}$ . *L. innocua* viable counts and injured cells were measured 2 h after UHPH treatment and after 3, 6, and 9 days of storage at  $4^\circ\text{C}$  for milk and after 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 days of storage at  $4^\circ\text{C}$  for orange juice. Both the inlet temperature and the food matrix influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the inactivation of *L. innocua*, which was higher in whole milk at the  $20^\circ\text{C}$  inlet temperature. The UHPH treatment caused few or no sublethal injuries in *L. innocua*. During storage at  $4^\circ\text{C}$  after treatments, counts increased by approximately 2 logarithmic units from day 0 to 9 in whole milk, whereas in orange juice counts diminished by approximately 2.5 logarithmic units from day 0 to 18.

Consumption of raw food is thought to be the most likely source of infection in diverse outbreaks that have occurred during the last decade (16). A broad spectrum of microbial pathogens can contaminate human food and cause illnesses after they or their toxins are consumed (23). Because of its ability to affect immunocompromised individuals, *Listeria monocytogenes* has been recognized as a widespread foodborne pathogen that may cause serious illness and even death in at-risk populations (22, 23). Outbreaks of listeriosis have been particularly associated with the consumption of raw milk or milk products elaborated with raw milk (23). Although *L. monocytogenes* is not known to have caused outbreaks through consumption of fruit juice, it has been isolated from unpasteurized apple juice (20) and is able to resist acidic conditions and storage at low temperatures in orange juice (15).

In food preservation processes, biological, chemical, and physical methods are used. Of the physical methods, heat treatment is the most commonly chosen preservation treatment for food and other perishable products. It is economical and efficient in inactivating microorganisms, but it cannot be used to treat heat-labile compounds. Furthermore, high temperatures may lead to adverse effects, such as off-flavors, nonenzymatic browning, and denaturation of certain vitamins and proteins (5, 25). During the last 15 years, considerable research efforts have been directed toward the development of new nonthermal processes for food pres-

ervation, such as the use of high hydrostatic pressure, pulsed electric field, UV light, ionizing radiation, pulsed light, and, more recently, ultrahigh-pressure homogenization (UHPH) (4, 5, 7). High-pressure treatments are considered to be the most promising emerging food-processing technology because of recent improvements in high-pressure machines and the introduction of pressure-processed foods (10, 13).

UHPH (also called dynamic high pressure) is based on the same design principles as conventional homogenization, which is used in the dairy industry to reduce the size of fat globules and prevent creaming and coalescence in long shelf storage, but at significantly higher pressures ( $>100$  MPa) (9, 24). Recently, UHPH has been investigated for the stabilization of fluid food mixtures and the recovery of cell proteins or other biochemicals from microorganisms. The latter application involves the destruction of large quantities of microorganisms by cell disintegration, which permits extraction of the desired substances. This technology appears to be an important means of lowering the initial microbial load while helping to minimize product damage from unnecessary heat stress (18, 24).

The effects of UHPH on bacterial cells are not well known yet, but microorganisms are probably disrupted by the sudden pressure decrease, torsion and shear stresses, and cavitation shock waves that result from imploding gas bubbles. In fluids, the collapse of such cavities could transmit several localized forces to the surfaces of particles such as microbial cells (8, 11, 12, 18). Some research in UHPH has shown changes in cell morphologic features, as well as

\* Author for correspondence. Tel: (34) 935811460; Fax: (34) 935812006; E-mail: arturxavier.roig@uab.es.

splits in the cytoplasmic membrane. Sudden increases in permeability or rupture of the cell membrane, which may occur under pressure, cause cell death. Kheadr et al. (10) observed that after a treatment of five cycles at 300 MPa, few intact *L. monocytogenes* cells were observed, and most appeared injured and either partially or completely emptied of their content. Similar results were shown by Vannini et al. (26) and Vachon et al. (25). They reported that UHPH treatments induced cell damage whose severity depends on the group of microorganisms and increases with pressure level and number of cycles. In particular, pressure levels over 80 MPa caused outer membrane damage or removal in gram-negative species. At higher pressure (150 MPa) more severe damage, including the discharge of cytoplasmic content, can be observed. Although previous research (24, 25) has demonstrated the effectiveness of UHPH in reducing foodborne pathogens in milk, little is known about the effects of this treatment on other food matrices. Besides, recent improvements in the production of UHPH machines permit the processing of liquid foods at pressures above 300 MPa, using a smaller number of cycles to reach the same lethality.

The main objective of this work was to evaluate the bactericidal efficacy of UHPH treatment at 300 MPa in the primary homogenizing valve and at 30 MPa in the secondary valve, in a single cycle, against *Listeria innocua* ATCC 33090 inoculated into whole milk and orange juice. We also studied the effect of inlet temperature on the degree of inactivation of this microorganism and the capacity of this UHPH treatment to cause sublethal injuries in microorganisms inoculated into whole milk and orange juice. We also determined its ability to survive, repair, and grow in refrigerated storage after the treatment. *L. innocua* ATCC 33090 has been suggested as a valid surrogate for *L. monocytogenes* in different surveys due to the risk involved in using pathogenic microorganisms (6, 14).

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains used and growth conditions.** *L. innocua* ATCC 33090 was obtained as freeze-dried cultures in thermosealed vials from the Spanish Type Culture Collection (University of Valencia, Valencia, Spain). Freeze-dried cultures were rehydrated in tryptone soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) at 37°C for 18 h. Subsequently, these broths were used to inoculate tryptone soy agar plate (Oxoid), and individual colonies were collected to prepare cryobeads (Nalgene System 100 Laboratories Microkit Iberica S.L., Madrid, Spain) of each strain. They were then kept at -20°C to provide stock cultures for the assays.

**Preparation of cell suspension and inoculation of whole milk and orange juice.** Before each experiment, one cryobead was inoculated into 10 ml of tryptone soy broth (Oxoid) and incubated at 37°C for 20 h. After incubation, the broth was spread using a disposable loop on tryptone soy agar slant (Oxoid) incubated at 37°C for 20 to 24 h. Subsequently, cell suspensions were prepared in 11 ml of tryptone sodium chloride solution (1 g of tryptone pancreatic casein digestion and 8.5 g/liter of sodium chloride) to obtain 9.0 log CFU/ml<sup>-1</sup> to 9.5 log CFU/ml<sup>-1</sup>. Thereafter, 1 ml of cell suspension was used to determine the concentration by means of optical density at 405 nm using a spectrophotometer (Cecil 9000 series, Cecil Instruments, Cambridge,

UK). Later, 10 ml of this cell suspension was inoculated in 1 liter of ultrahigh-temperature whole milk and ultrahigh-temperature orange juice at room temperature. The final concentration of cells in milk was of 7.0 log CFU/ml<sup>-1</sup> to 7.5 log CFU/ml<sup>-1</sup>. The milk and orange juice inoculated samples were placed for 70 min at 6 and 20°C in a water bath to reach pressurization temperature.

### High-pressure treatment of whole milk and orange juice.

UHPH treatments were applied to milk and orange juice samples using a Stansted high-pressure homogenizer (model DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). This high-pressure machine comprises a high-pressure valve made of resistant ceramics able to support 350 MPa. It also comprises a second pneumatic valve able to support 50 MPa located behind the first one. The high-pressure system consists of two intensifiers (80-ml useful volume) driven by a hydraulic pump. The flow rate of the milk and juice in the homogenizer was constant (18 liters h<sup>-1</sup>). To avoid poor homogenization performance due to temperature increase and rapid expansions or contractions in the first-stage valve, the latter is cooled by constant circulation of water at ambient temperature in an external jacket built around the valve. Milk and orange juice samples were subjected to a single cycle at UHPH of 300 + 30 MPa (300 MPa at the primary homogenizing valve and 30 MPa at the secondary valve) at inlet temperatures of 6 and 20°C. For the experiment, 2.0 liters of inoculated milk and 2.0 liters of orange juice were used, with most of this volume being processed through the homogenizer to ensure temperature equilibration. Afterward, between 80 and 100 ml of the samples was taken for analysis. The homogenized samples were rapidly cooled. They reached an outlet temperature of 16.0 to 18.0°C by means of (i) an external jacket built around the pipeline located between the first and second homogenizing valves and (ii) a spiral type heat-exchanger (BCI/2843 type, Occo Cooler Ltd., Telford, UK) located behind the second valve. The samples were immediately stored at 4°C.

### Cleaning and disinfection of the high-pressure machine.

A specific sanitation program for the UHPH machine was developed. The machine was cleaned and disinfected immediately after submitting the milk and orange juice samples to UHPH treatment. For the development of this sanitation program, previous evaluations were realized to determine the bactericidal activity of the disinfectant by using a quantitative test of suspension (in vitro experiences) (1, 2). The disinfectant agent used was a mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide (P3-Oxonia Active, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, Spain), a commercially available product intended for use in the food industry. We also performed several experiments to adjust the conditions of cleaning and disinfection in the high-pressure machine. The sanitation sequence was as follows: (i) to rinse with sterile distilled water at 70°C; (ii) to circulate a sterile tensoactive neutral solution at 5% (vol/vol) at 70°C by 20 min; (iii) to clarify with sterile distilled water at 70°C; (iv) to disinfect with a solution at 2.5% (vol/vol) of disinfectant agent made with sterile distilled water at 40°C for 120 min; and (v) to rinse with sterile distilled water at room temperature. Subsequently, we collected 1.4 liters of the rinsing water in two sterile bottles (700 ml in each bottle) to control the procedure of cleaning and disinfection of the machine. The rinsing water was filtered through a sterile filter membrane of 0.45 µm (Millipore S.A., Molsheim, France). Subsequently, the filter membrane was placed on a plate of tryptone soy agar (Oxoid) supplemented with 6 g/liter of yeast extract (TSAYE) and incubated at 37°C for 48 h.

**Microbiological analysis.** To determine the initial number of cells in the inoculated samples of milk and orange juice at 6 and 20°C, 1 ml of each sample was used to prepare decimal dilutions in peptone water (10 g/liter of peptone and 5 g/liter of NaCl, Oxoid). Subsequently, 1 ml of these dilutions was placed in duplicate in TSAYE and incubated at 37°C for 48 h. Additionally, to determine the possible injury caused by its low pH, the orange juice sample was plated in duplicate in TSAYE supplemented with 30 g/liter of NaCl (TSAYE+NaCl; Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) (17). Also, 20 ml of the untreated inoculated samples was placed into sterile tubes and stored at 4°C. These samples were called controls and were included to determine the number of cells in untreated inoculated samples.

Microbiological analysis of treated samples and controls was performed 2 h after the UHPH treatment. Whole milk and orange juice samples were kept at 4°C and analyzed after 3, 6, and 9 days of storage and after 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 days of storage, respectively. To assess the lethality and the level of injuries caused by UHPH treatment, decimal dilutions in peptone water (Oxoid) of untreated and treated milk and orange juice samples were prepared and plated in duplicate in TSAYE and TSAYE+NaCl and incubated at 37°C for 48 h. The use of this differential plating technique, which consisted of TSAYE and TSAYE+NaCl, enables injuries to be monitored. Both noninjured and injured cells were able to form colonies on TSAYE, whereas only noninjured cells formed colonies in the presence of NaCl (17). Results were expressed as the logarithm of CFU per milliliter. Lethality was calculated as the difference between the logarithms of colony counts of the untreated and treated samples ( $\log N_0 - \log N$ ).

**Statistical treatment of data.** All experiments were repeated four times with duplicate analysis in each replicate. Data are presented as least square means of each experiment. Analysis of variance was performed using the General Linear Models procedure of the SAS System (21). Evaluation was based at a level of significance of  $P < 0.05$ .

## RESULTS

The inactivation of *L. innocua* ATCC 33090 by UHPH treatment at 300 + 30 MPa for one cycle and inlet temperatures of 6 and 20°C in whole milk and orange juice is shown in Figure 1. Both the inlet temperature of sample and the kind of food matrix influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the degree of inactivation of this microorganism. The results indicated that when the temperature increased, the lethality values were higher for both matrices. The highest lethality values in *L. innocua* were observed in the whole milk matrix at inlet temperature of 20°C (4.31 log CFU/ml). When comparing the lethality values of *L. innocua* among TSAYE and TSAYE+NaCl within the same food matrix and the same inlet temperature, no significant differences were observed, indicating that the UHPH treatment caused few or no sublethal injuries in *L. innocua*.

Counts of *L. innocua* in whole milk pressurized at 300 + 30 MPa and stored at 4°C for 9 days are shown in Figure 2. Changes in viable counts in both media for pressurized samples at both inlet temperatures (6 and 20°C) were similar; they increased approximately 2 log units from day 0 to 9. When comparing changes in counts of *L. innocua* among TSAYE and TSAYE+NaCl from day 0 to 9 at the same inlet temperature, no significant differences were observed in viable counts on any day, confirming that UHPH

treatment caused no sublethal injury in the strain tested. Moreover, the temperature of storage did not exert any significant effect on the population of *L. innocua*, showing its ability to survive and grow in refrigerated storage after UHPH treatment in whole milk. In the control and treated samples, the microorganism showed a similar behavior. These facts confirm the capacity of this strain for surviving and growing in conditions of cooling even after UHPH treatment.

Changes in the population of *L. innocua* in orange juice pressurized at 300 + 30 MPa for 21 days of storage at 4°C is shown in Figure 3. The viable counts of *L. innocua* in pressurized samples at the same temperature in the two culture media did not differ during storage, although they showed a decreasing tendency throughout the 21 days. This indicates that UHPH treatment of orange juice samples caused no sublethal injury in the strain tested. However, *L. innocua* showed inability of survival and growth at low temperatures in the acidic conditions of orange juice. The low pH of orange juice (3.6) could have caused interferences in the evolution of the viable counts of *L. innocua* at low temperatures, making them decrease to very low levels by day 21. Viable counts of pressurized samples at both temperatures and for both media were similar, diminishing by approximately 2.5 log units from day 0 to 18. The control samples showed behavior similar to the treated samples, diminishing by approximately 2 log units from day 0 to 21.

## DISCUSSION

Our work demonstrates the capacity of UHPH to reduce levels of *L. innocua* in whole milk and orange juice. Under similar pressure conditions (300 + 30 MPa single cycle) approximately 4.3 log units of reduction in viable counts was obtained for this strain in whole milk at 20°C, whereas in orange juice at the same temperature a reduction of approximately 3.6 log units of viable counts was achieved. Kheadr et al. (10) have indicated reductions of four log cycles in viable counts with the same strain tested in our study (*L. innocua* ATCC 33090) inoculated in skim milk and milk with 2% fat, but to achieve these reductions in their study it was necessary to pressurize at 200 MPa for five cycles at an inlet temperature of 28°C. Similar reductions (4 log units) were reported by Vachon et al. (25) for *L. monocytogenes* inoculated in raw milk pressurized at 300 MPa, but using three cycles, with the same model of high-pressure machine used by Kheadr et al. (10), whereas the reduction obtained after just one cycle at 300 MPa was lower than 1 log unit.

Vachon et al. (25) also determined the effect of preheating the milk (45, 55, and 60°C) on bacterial reduction, observing that the lethal effect increased when increasing the inlet temperature. Heating the milk to 60°C brought an additional reduction of 1.5 logarithmic units in viable counts of *L. monocytogenes* compared with samples inlet at 55°C. Similar behavior has been shown in another study (4) for *Escherichia coli* inoculated in phosphate-buffered saline and pressurized using UHPH in which the authors reported that the bacterial inactivation increased with an



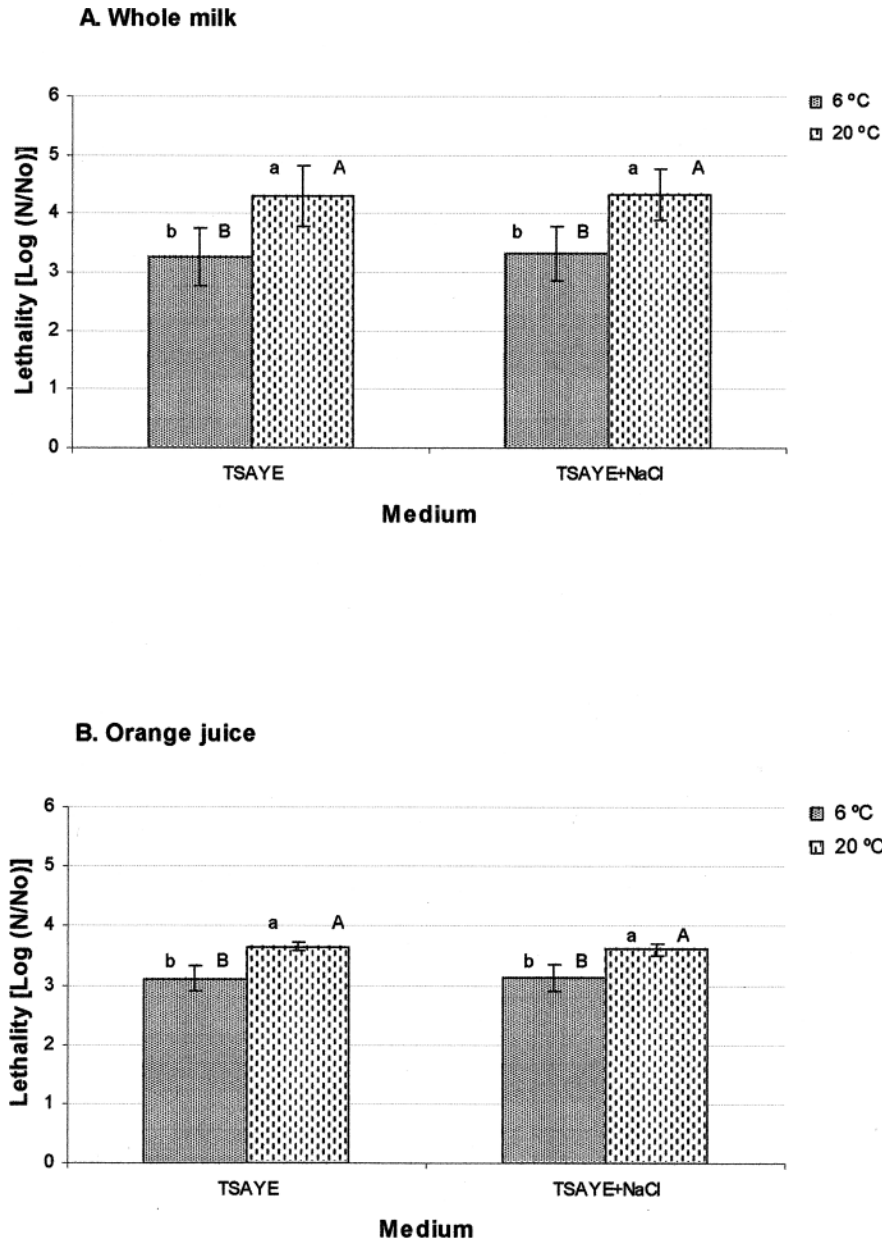


FIGURE 1. Inactivation of *Listeria innocua* (ATCC 33090) in whole milk (A) and orange juice (B) treated with ultrahigh-pressure homogenization (300 + 30 MPa) using inlet temperatures of 6 and 20°C. Survivors were enumerated using tryptone soy agar with yeast extract (TSAYE) and TSAYE with 30 g/liter of salt added (TSAYE+NaCl) with incubation at 37°C for 48 h. Bars with different superscript small letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same media. Bars with different superscript capital letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same inlet temperature. Data are presented as the mean values of four replications  $\pm$  confidence intervals.

increase in the inlet temperature (5, 20, 25, 35, 45, and 50°C). In this work, the researchers suggest that the effect of the inlet temperature on bacterial inactivation can be explained by the decrease of the viscosity caused by an increase of temperature. No information has been found in previous studies about the effect on the reduction of viable counts of *L. innocua* at the inlet temperatures used in our work (6 and 20°C) with UHPH treatments. However, we also observed an increase in lethality with an increase in the inlet temperature, suggesting a clear effect of temperature on the lethality values.

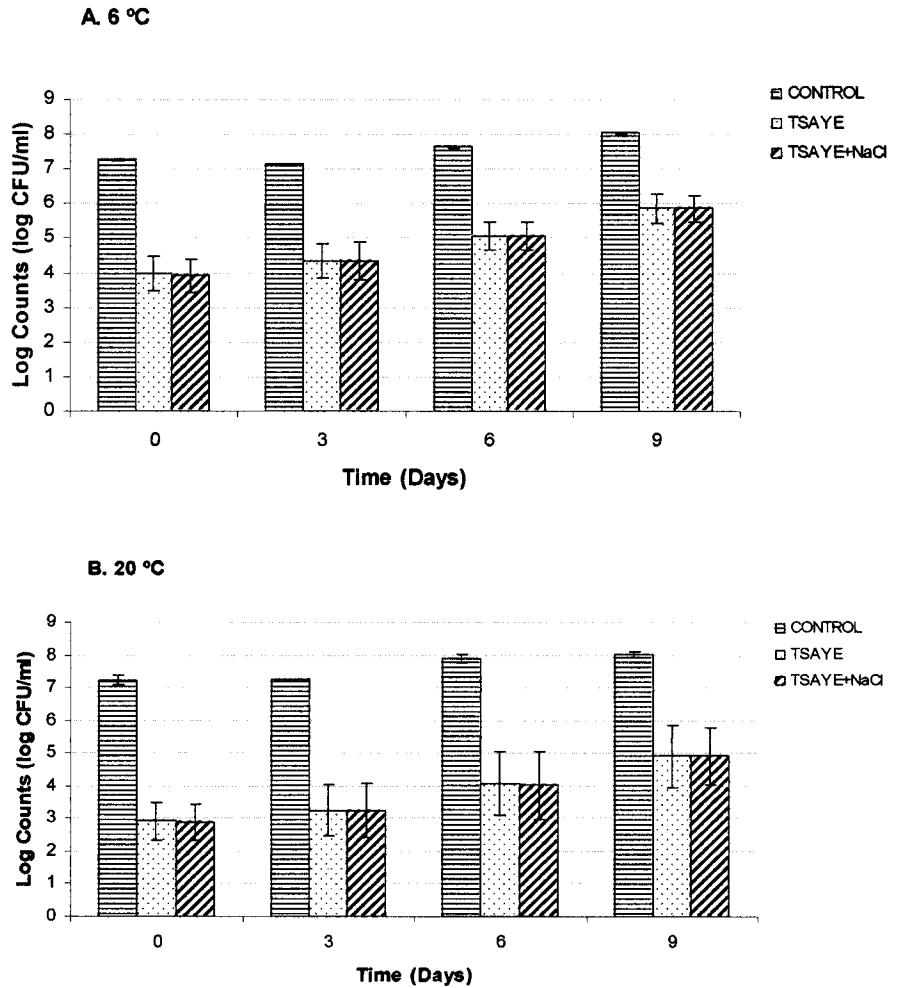
The results of our investigation suggest the use of temperatures over 20°C to achieve reductions superior to 4 logarithmic units in future trials. UHPH technology together with an increased inlet temperature of the sample before the process may offer a promising alternative to the pasteurization of milk and others liquid foods.

In our study, we observed a clear difference between

food matrices in the inactivation degree of *L. innocua*. The strain tested was more resistant to UHPH treatment at low temperatures in both food matrices but reached the highest lethality values in whole milk. Vachon et al. (25) obtained a reduction of approximately 8 log CFU/ml in the counts of *L. monocytogenes* inoculated in phosphate-buffered saline and of approximately 6 log CFU/ml in milk after a UHPH treatment of five cycles at 300 MPa.

No information has been found in previous studies on the changes in the numbers of *L. innocua* inoculated into orange juice and whole milk treated with UHPH. In our work, the changes in viable counts in these matrices differed. In whole milk, the counts increased by approximately 2 log units from day 0 to 9. Another study (26) reported an increment of the viable counts of *L. monocytogenes* of approximately 3.0 log units in skim milk after being treated at 130 MPa and incubated at 37°C for 3 days. On the contrary, in orange juice the counts diminished by approxi-

FIGURE 2. Viable counts of *Listeria innocua* (ATCC 33090) during storage of inoculated whole milk at 4°C after treatment with 300 + 30 MPa pressure at 6 (A) and 20°C (B). Data are presented as the mean values of four replications  $\pm$  confidence intervals.



mately 2.5 log units from day 0 to 18. Our results indicate that whole milk stimulated the growth of *L. innocua* in refrigerated storage after UHPH treatment. The characteristics of whole milk (pH close to neutrality [6.7], large presence of nutrients) could have favored the increase of the viable counts of *L. innocua* at low temperatures. On the other hand, in orange juice, the low pH (3.6) could have inactivated *L. innocua*, making it decrease to low levels by day 21. The UHPH treatment was more efficient against *L. innocua* when it was applied in whole milk than in orange juice under the same conditions. This finding is in contrast with some observations made in different foods treated by high hydrostatic pressure, where bacteria showed the highest sensitivity to the treatments at lower pH values (19).

The results of our work also indicate that UHPH treatment (300 + 30 MPa) caused insignificant sublethal injury to *L. innocua*. Similar results were reported by Wuytack et al. (27), who did not observe sublethal injury in *L. innocua* inoculated into phosphate-buffered saline after UHPH treatment. This is the point that clearly makes the effect of this technology different from high hydrostatic pressure, which can cause accumulation of sublethal injuries, leading to subsequent recovery of the cells, depending on the conditions of treatment and later storage (3). If the cells that survive UHPH treatment are not injured, it can be supposed that they will not be more sensitive to other treatments or

to unfavorable growing conditions, such as low pH or low temperature. In our trials we observed that storage at low pH and temperature decreased the viable counts of *L. innocua* in both control and treated samples. No significant differences were observed in viable counts on any day of storage between TSAYE and TSAYE+NaCl at the same inlet temperature. In contrast, *L. innocua* counts increased from 0 to 9 days of storage in whole milk.

The results of the present study allow us to conclude that UHPH treatments of whole milk and orange juice at 300 + 30 MPa at inlet temperatures of 6 and 20°C were efficient in reducing the viable counts of *L. innocua*. The lethality increased with the inlet temperature, suggesting a clear effect of the temperature on the lethality values. The kind of matrix significantly influenced both the efficacy of the treatment and the growing capability of *L. innocua* during the subsequent storage period, but in a different way. Although the highest lethality values caused by UHPH treatments were obtained in whole milk, a decrease in the viable counts of *L. innocua* was observed in orange juice, whereas in milk the counts increased during storage at 4°C. UHPH treatment (300 + 30 MPa) did not cause significant sublethal injuries to *L. innocua* in any of the cases. UHPH technology may offer a promising alternative to the pasteurization of milk and other liquid foods supported by the

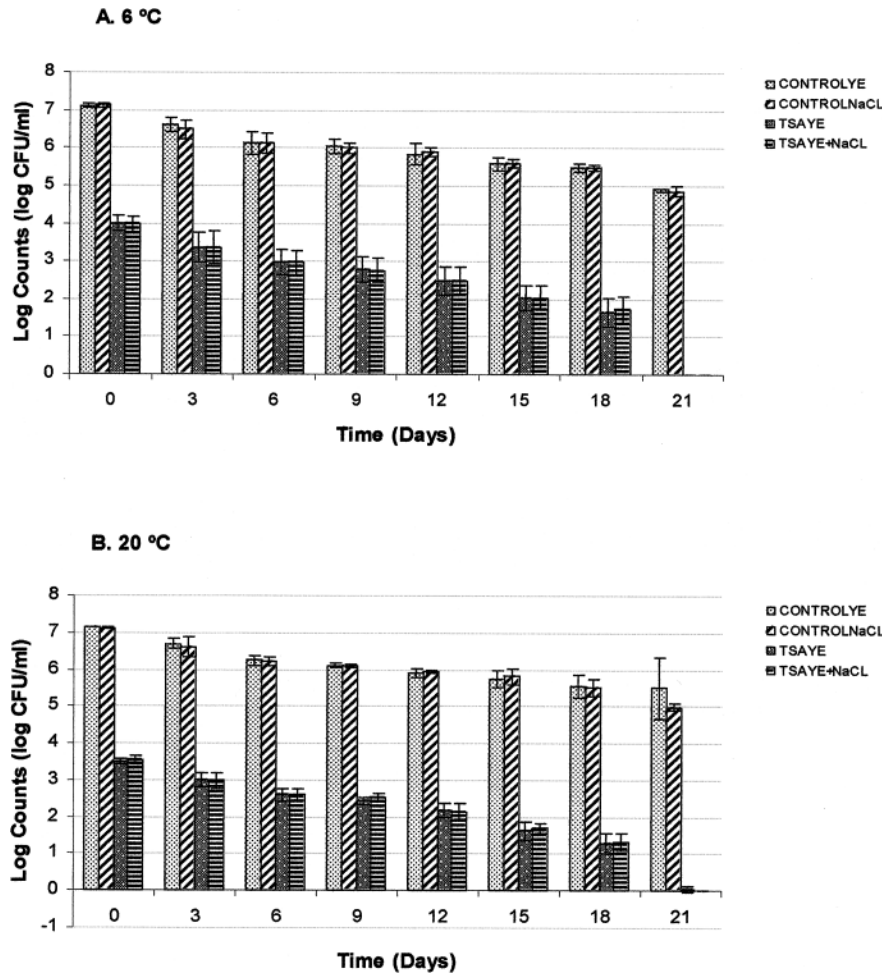


FIGURE 3. Viable counts of *Listeria innocua* (ATCC 33090) during storage of inoculated orange juice at 4°C after treatment with 300 + 30 MPa pressure at 6 (A) and 20°C (B). Data are presented as the mean values of four replications  $\pm$  confidence intervals.

possibility of increasing the inlet temperature of the sample before the process.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the financial support received from the Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia Dels Aliments (CERPTA) by means of the CRAFT Project 512626 UHPH, which permitted us to accomplish this research, and the grant given to Wilfredo José Briñez Zambrano by the Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (FONACIT) and Universidad del Zulia of Venezuela. Furthermore, we also thank the Colección Española de Cultivos Tipo for providing the strains used in this study.

## REFERENCES

- Briñez, W. J., A. X. Roig-Sagués, M. M. Hernandez, and B. Guamis. 2004. Eficacia bactericida del ácido peracético contra cepas patógenas y no patógenas de *Escherichia* y *Listeria* spp. en presencia de materia orgánica. Comunicación en: X Congreso Anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Madrid, España.
- Briñez, W. J., A. X. Roig-Sagués, M. M. Hernandez, T. López-Pedemonte, and B. Guamis. 2006. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. *Food Control*, in press.
- De Iamocastellví, S., M. Capellas, T. López-Pedemonte, M. M. Hernández-Herrero, B. Guamis, and A. X. Roig-Sagués. 2005. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 68:528–523.
- Diels, A. M. J., L. Callewaert, E. Y. Wuytack, B. Masschalck, and C. W. Michels. 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. *Biotechnol. Prog.* 20:1512–1517.
- Diels, A. M. J., E. Y. Wuytack, and C. W. Michels. 2003. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 87:55–62.
- Fairchild, T. M., and P. M. Foegeding. 1993. A proposed nonpathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1247–1250.
- Gervilla, R., V. Ferragut, and B. Guamis. 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *J. Dairy Sci.* 83:674–682.
- Guerzoni, M. E., L. Vannini, C. Chaves López, R. Lanciotti, G. Suzzi, and A. Gianotti. 1999. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemo-physical characteristics of goat chesses. *J. Dairy Sci.* 82:851–862.
- Hayes, M. G., and A. L. Kelly. 2003. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *J. Dairy Res.* 70:297–305.
- Kheadr, E. E., J. F. Vachon, P. Paquin, and I. Fliss. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12:435–446.
- Lanciotti, R., C. Chavez-Lopez, F. Patrignani, A. Paparella, M. E. Guerzoni, A. Serio, and G. Suzzi. 2004. Effects of milk treatments with dynamic high pressure on microbial populations, and lipolytic and proteolytic profiles of Crescenza cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57:19–25.
- Lanciotti, R., F. Gardini, M. Sinigaglia, and M. E. Guerzoni. 1996. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:165–168.

13. Lucore, L. A., T. H. Shellhammer, and A. E. Yousef. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *J. Food Prot.* 63:662–664.
14. MacDonald, F., and A. D. Sutherland. 1993. Effect of heat treatment on *Listeria monocytogenes* and gram-negative bacteria in sheep, cow and goat milks. *J. Appl. Bacteriol.* 75:336–343.
15. Martínez-González, N. E., A. Hernández-Herrera, L. Martínez-Chávez, M. O. Rodríguez-García, M. R. Torres-Vitela, L. Mota de la Garza, and A. Castillo. 2003. Spread of bacterial pathogens during preparation of freshly squeezed orange juice. *J. Food Prot.* 66:1490–1494.
16. Orden, J. A., D. Cid, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, S. García, S. Martínez, and R. De la Fuente. 2002. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 93:29–35.
17. Patterson, M. F., M. Quinn, R. Simpson, and A. Gilmour. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J. Food Prot.* 58:524–529.
18. Popper, L., and D. Knorr. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technol.* 44:84–89.
19. Ritz, M., F. Jugiau, F. Rama, P. Courcoux, M. Semenou, and M. Federighi. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiol.* 17:375–382.
20. Sado, P. N., K. C. Jinneman, G. J. Busby, S. M. Sorg, and C. J. Omiecinski. 1998. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. *J. Food Prot.* 61:1199–1202.
21. Statistical Analysis Systems Institute. 1999. User's guide. Version 8. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
22. Tarté, R., E. A. Murano, and D. G. Olson. 1996. Survival and injury of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii* in ground pork following electron beam irradiation. *J. Food Prot.* 59:596–600.
23. Tauxe, R. V. 2002. Emerging foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 78:31–41.
24. Thiebaut, M., E. Dumay, L. Picart, J. P. Guiraud, and J. C. Cheftel. 2003. High-pressure of raw bovine milk: effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* 13:427–439.
25. Vachon, J. F., E. E. Kheadr, J. Giasson, P. Paquin, and I. Fliss. 2002. Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *J. Food Prot.* 65:345–352.
26. Vannini, L., R. Lanciotti, D. Baldi, and M. E. Guerzoni. 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *Int. J. Food Microbiol.* 94:123–136.
27. Wuytack, E. Y., A. M. J. Diels, and C. W. Michels. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 77:205–212.

CAPÍTULO  
SEXTO

---

**Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation**

**Inactivación de dos cepas de *Escherichia coli* inoculadas en leche entera y desnatada por ultra alta presión de homogeneización**

Le Lait, (2006) Article in press

**Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation**

**Wilfido José Briñez, Artur X. Roig-Sagués\*, M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero,  
Buenaventura Guamis López**

*Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra (Barcelona) Spain*

**Abstract**

The inactivation by ultrahigh-pressure homogenisation (UHPH) of *Escherichia coli* ATCC 10536 and *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 inoculated into whole and skim milk was investigated. Samples of UHT whole and skim milk inoculated at a concentration of approximately 7.0 Log<sub>10</sub> (cfu mL<sup>-1</sup>) were pressurized in a two valve system UHPH machine at 300 MPa at the primary homogenising valve and at 30 MPa at the secondary valve. Inlet temperatures of milk were 6.0 °C and 20 °C. Viable and injured bacterial counts were measured two hours after UHPH treatment and after 3, 6, and 9 days of storage at 4 °C. The type of milk significantly influenced ( $P < 0.05$ ) the degree of inactivation reached in both strains of *E. coli*, being higher at 20 °C in whole milk. The level of inactivation was similar for *E. coli* ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, reaching lethality values of 4.30 and 3.94 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup> respectively at an inlet temperature of 20 °C. No sublethal injuries were detected after treatments. The changes cultivable cells during storage at 4 °C was similar in whole and skim milk although *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 strain showed significant differences with a decreasing tendency of approximately 0.3 logarithmic units between 0 and 9 days of storage.

**Ultrahigh-pressure homogenisation; lethality; Milk; *Escherichia coli* O157:H7; sublethal injury**

**Résumé**

**Inactivation de deux souches d'*Escherichia coli* inoculés au lait entier et écrémé par très haute pression d'homogénéisation.** L'inactivation par très haute pression d'homogénéisation (UHPH) d'*Escherichia coli* ATCC 10536 et d'*Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 inoculés au lait entier et au lait écrémé a été étudiée. Des échantillons de lait entier et écrémé (UHT) ont été inoculés avec des souches d'une concentration approximative de  $7,0 \text{ Log}_{10} (\text{cfu mL}^{-1})$  ensuite ont été mis sous pression dans une machine de UHPH composée de deux valves, le premier avec un système de soupape homogénéisant à 300 MPa, le second avec un soupape à 30 MPa. Les températures initiales du lait étaient de 6,0 °C et de 20 °C. Le comptage des microorganismes vivants et ceux ayant subi des dommages a été fait 2 heures après le traitement de UHPH et au 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, et 9<sup>ème</sup> jours de conservation à 4 °C. La nature du lait a influencé significativement ( $P < 0,05$ ) le degré d'inactivation atteint dans les deux souches d'*E. coli*, et de manière plus importante pour le lait entier ayant une température de 20 °C. Le niveau d'inactivation était similaire pour *E. coli* ATCC 10536 et *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, atteignant respectivement les valeurs létales de 4,30 et 3,94  $\text{Log}_{10} \text{ cfu mL}^{-1}$  à une température initiale de 20 °C. Aussi, aucun dommage sublétales n'a été détecté sur les souches après les traitements. L'évolution des microorganismes vivant durant la conservation à 4 °C était similaire au niveau du lait entier et écrémé. Les microorganismes de la souche *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 ont enregistré des différences significatives entre le 1<sup>er</sup> jour et le 9<sup>ème</sup> jour de conservation, avec une tendance à la baisse de 0,3 unités logarithmiques approximatives.

**Très haute pression homogénéisation; létale ; le Lait ; *Escherichia coli* O157 :H7; la blessure sublétales**

## 1. Introduction

The nutritional attributes of milk which make it an important part of the human diet are the same components that support the growth of many pathogenic bacteria associated with milk and dairy products (Wang et al., 1997). A broad spectrum of microbial pathogens can contaminate human food and cause illnesses when they or their toxins are consumed (Tauxe, 2002). Contaminated milk and dairy products have been associated with foodborne outbreaks caused by *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 (Altekruse et al., 1998; Sparling, 1998; Johnson et al., 1995; Wang et al., 1997). Consumption of raw milk contaminated with *Escherichia coli* O157:H7 is probably the most likely source of infection in diverse outbreaks which have occurred during the last decade (Orden et al., 2002; Sparling, 1998; Simmons, 1997).

Heat treatment is the most commonly chosen preservation method for milk and other perishable liquid foods. Thermal processing has a long tradition in food preservation because it is economical and efficient in achieving microbial inactivation, but it cannot be used to treat heat-labile compounds. Furthermore, high temperatures may lead to undesirable effects in milk such as off-flavours, nonenzymatic browning and denaturation of certain vitamins and proteins (Diels et al., 2005; Diels et al., 2003; Vachon et al., 2002).

The growing trend for fresher, high quality convenience food has generated an increasing interest in non-thermal processing alternatives, such as high pressure technologies, which are considered to be the most promising emerging food-processing technologies due to recent advances in high pressure machinery and the successful introduction of pressure processed foods (Diels et al., 2005; Diels et al., 2003; Kheadr et al., 2002; Gervilla et al., 2000; Lucore et al., 2000). Ultrahigh-pressure homogenisation UHPH (also called dynamic high pressure in literature) is based on the same design principles as conventional homogenisation processes that are used in the dairy industry for reducing the size of fat globules (Hayes and Kelly,



2003; Thiebaud et al., 2003; Vachon et al., 2002), but working at significantly higher pressures (> 200 MPa), resulting in the destruction of large quantities of microorganisms. Consequently this technology appears to be an important means of lowering the initial microbial load while helping to minimize product damage from unnecessary heat stress (Popper and Knorr, 1990). The effects of UHPH on bacterial cells are not yet well known, but some studies on UHPH have shown changes in bacterial cell morphology, as well as splits in the cytoplasmic membrane. Sudden increases in permeability or rupture of the cell membrane, such as may occur under pressure, cause cell death (Kheadr et al., 2002; Vachon et al., 2002; Guerzoni et al., 1999; Lanciotti et al., 1996). Vannini et al. (2004) and Vachon et al. (2002) reported that the UHPH treatments induced cell damage whose severity increased with pressure level and number of cycles to which the sample was submitted. The damage observed was more severe on bacterial cells including discharges of cytoplasmic content when pressure increased. Is scarce the information concerning the effect of the matrix on the degree of inactivation showed by the microorganisms. The available results seem to indicate that UHPH treatments were more effective against microorganisms in saline buffered solutions than in more complex matrices such as milk (Diels et al., 2005; Vachon et al., 2002).

The main objective of this work was to study the inactivation of two different strains of *Escherichia coli*: *E. coli* O59:H21 (ATCC 10536) and *E. coli* O157:H7 (CCUG 44857) inoculated into whole and skim milk using a new generation UHPH machine with two intensifiers and a double-valve system. We also studied the effect of inlet temperature of the milk, type of food matrix and the strain kind on the inactivation rate, the capacity of UHPH treatments to produce sublethal injuries, and the ability of the microorganisms to repair and grow during further refrigerated storage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains used and growing conditions

*Escherichia coli* O59:H21 ATCC 10536 and *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 were obtained as freeze-dried cultures in thermosealed vials from the Spanish Type Culture Collection (University of Valencia, Valencia Spain). Freeze-dried cultures were rehydrated in tryptone soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) at 37 °C for 18 h. Subsequently, these broths were used to inoculate tryptone soy agar plate (Oxoid), and individual colonies were collected to prepare cryobeads (Nalgene® System 100™ Laboratories Microkit Iberica S.L., Madrid, Spain) of each strain. They were then kept at -20 °C to provide stock cultures for the assays.

### 2.2. Preparation of cell suspension and inoculation of whole and skim milk

Prior to each experiment one cryobead was inoculated into 10 mL of tryptone soy broth (Oxoid) and incubated at 37 °C for 20 h. After incubation, the broth was spread using a disposable loop on tryptone soy agar slant (Oxoid) incubated at 37 °C for 20-24h. Subsequently, cell suspensions were prepared in 11 mL tryptone sodium chloride solution (TSC) (1 g of L<sup>-1</sup> tryptone pancreatic casein digestion and 8.5 g L<sup>-1</sup> sodium chloride) in order to obtain 9.0 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup> to 9.5 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup>. Thereafter, 1 mL of cell suspension was used to determine the concentration by means of optical density at 405 nm (405 OD<sub>405</sub>) using a spectrophotometer (Cecil 9000 series, Cecil instruments, Cambridge, England). Later, 10 mL of this cell suspension was inoculated in one L of UHT whole and skim milk at room temperature. The final concentration of cells in milk was of 7.0 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup> to 7.5 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup>. The inoculated milk samples were placed for 70 min at 6 and 20 °C in a water bath to reach pressurisation temperature.

### *2.3. Ultrahigh-pressure homogenisation treatment of the milk*

UHPH treatments were applied to the milk samples using a Stansted high pressure homogeniser (model/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). This high pressure machine comprises two intensifiers (80 mL useful volume), driven by a hydraulic pump and a high pressure valve made of resistant ceramics able to support 350 MPa. It also comprises of a second pneumatic valve able to support 50 MPa located behind the first one. All these components guarantee a constant flow rate (18 L h<sup>-1</sup>) during the process. To avoid poor homogenisation performance due to temperature increase and rapid expansions or contractions in the first stage valve, the latter is cooled by constant circulation of water at room temperature in an external jacket built around the valve. Milk was subjected to a single cycle at UHPH of 300 MPa at the primary homogenising valve and 30 MPa at the secondary valve (300 + 30 MPa) at inlet temperatures of 6 and 20 °C. For the experiment 2.0 L of each type of inoculated milk were used, with the majority of this volume being processed through the homogeniser to ensure temperature equilibration. Afterwards, between 80 and 100 mL of the samples were taken for analysis. The homogenised samples reached an outlet temperature of 16.0 to 18.0 °C by means of: (i) an external jacket built around the pipeline located between the first and second homogenising valves and (ii) a spiral type heat-exchanger (BCI/2843 type, Occo Cooler Ltd., Telford, UK) located behind the second valve. The samples were immediately stored at 4 °C.

A specific sanitation programme developed for the UHPH machine was applied each time immediately after submitting the milk samples to UHPH treatment. A mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide (P3-Oxonia Active, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, Spain) was used as a disinfectant agent, whose bactericidal efficacy was previously evaluated using a quantitative test of suspension (Briñez et al., 2006a). We also carried out several experiments to adjust the conditions of cleaning

and disinfection in the UHPH machine. The sanitation sequence of the machine was applied according to methodology developed by Briñez et al. (2006b).

#### *2.4. Microbiological analysis*

To determine the initial number of cells in the inoculated samples of milk at 6 and 20 °C, 1 mL of each sample was used to prepare decimal dilutions in peptone water (Oxoid, 10 g L<sup>-1</sup> peptone and 5 g L<sup>-1</sup> NaCl). Subsequently, 1 mL of these dilutions was placed in duplicate in tryptone soy agar plate (Oxoid) supplemented with 6 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Oxoid, TSAYE) and incubated at 37 °C for 48 h. Also, 20 mL of the untreated inoculated samples (controls) were placed into sterile tubes and stored at 4 °C.

The first microbiological analysis of treated and control samples was performed 2 h after the UHPH treatment. Afterwards samples were kept at 4 °C and analyzed after 3, 6 and 9 days of storage. To assess the lethality and the level of injuries caused by UHPH treatment, decimal dilutions in peptone water (Oxoid) of untreated and treated milk samples were prepared and plated in duplicate in TSAYE, and TSAYE supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> of NaCl (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain; TSAYE+NaCl) and incubated at 37 °C for 48 h. The use of this differential planting technique enables injuries to be monitored. Both noninjured and injured cells were able to form colonies on TSAYE, whereas only noninjured cells formed colonies in the presence of NaCl (Patterson et al., 1995). Results were expressed as the logarithm of cfu mL<sup>-1</sup>. Lethality was calculated as the difference between the logarithms of colony counts of the untreated and treated samples (Log N<sub>0</sub>- Log N).

#### *2.5. Statistical treatment of data*

All experiments were repeated four times with duplicate analysis in each replicate. Data are presented as least square means of each experiment. Analysis of

variance was performed using the General Lineal Models Procedure (GLM) of SAS<sup>®</sup> System (SAS, 1999). Evaluation was based at a level of significance of  $P < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

UHPH treatments applied at 300 + 30 MPa in a single cycle at inlet temperatures of 6 °C and 20 °C were able to reduce significantly the counts of *E. coli* ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857. No statistical differences between strains were found when the treatment was applied in the same matrix and at the same inlet temperature (Fig. 1). Either the inlet temperature of sample or the type of food matrix significantly influenced ( $P < 0.05$ ) the degree of inactivation reached. The highest lethality values were observed for the strain *E. coli* ATCC 10536 inoculated in whole milk at an inlet temperature of 20 °C (4.30 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup>). The inoculated samples of skim milk treated at 6 °C showed the lowest values of lethality for *E. coli* ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 (3.15 and 3.32 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup> respectively).

Diels et al. (2005) also reported reductions around 3.5 Log<sub>10</sub> cycles in *E. coli* (strain MG1655) when inoculated in skim milk pressurised at 300 MPa in one single cycle, but using a higher inlet temperature (25 °C). Inlet temperature may influence the maximum temperature reached during the process, and consequently, may affect the lethality reached. In our work the lethality increased 0.13 - 0.70 Log<sub>10</sub> cycles depending on the matrix type when the inlet temperature increased from 6 °C to 20 °C. However, these lethalties are still far away from the ones described by Vachon et al. (2002) who reported reductions of approximately 8 Log<sub>10</sub> cycles in cultivable cells in another strain of *E. coli* (*E. coli* O157:H7 ATCC 35150) when inoculated in whole raw milk pressurised at 300 MPa with an inlet temperature of 25 °C using the same model of UHPH machine employed by Diels, et al. (2005) (Emusiflex C5, Avestin, Ottawa, Canada). They also reported that increasing the milk temperature from 55 °C to 60 °C brought an additional reduction of 1.2 logarithmic units in cultivable cells of *E. coli* O157:H7. This seems to indicate that the type of strain used (*E. coli* MG1655

or *E. coli* O157:H7 ATCC 35150) and pressurisation conditions (control of the rise in temperature during and after of the pressurisation) may influence the results, although in our study, we did not detect significant differences between both strains of *E. coli*. An inlet temperature of 6 °C would be interesting for the milk industry since milk could be treated just after being unloaded from the containers without breaking out the refrigeration conditions. However, 3 Log<sub>10</sub> units of reduction could not be sufficient depending on the microbiological quality of raw milk.

The other factor that greatly influences the efficacy of the treatments is the kind of matrix. If we compare the reductions shown by Vachon et al. (2002) with the ones reported by Diels et al. (2005) at the same pressure and inlet temperature (300 MPa, 25 °C), a clear difference between skim milk and whole milk is observed in favour of whole milk, results that agree with the ours although they used slightly higher temperatures (25 °C). Moreover, Vachon et al. (2002) also observed lower lethality values for *E. coli* O157:H7 when treated (300 MPa at 25 °C of inlet temperature and one pass) in phosphate-buffered saline (6 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup> approximately) than when was inoculated in raw milk (8.5 Log<sub>10</sub> cfu mL<sup>-1</sup>).

Similar results were previously reported by Gervilla et al. (2000) in milk with different percentages of fat (0, 6 and 50 %), but treated with high hydrostatic pressure (400 MPa, 15 minutes). Seems that fat increases the piezosensibility of the microorganisms in contrast with heat treatments where fat is assumed to have a protective effect. These researchers suggested that the cause might be the increase of the concentration of certain liposoluble substances with an antimicrobial effect caused by the increase in the fat content, which causes interchanging of triglycerides of milk with lipoproteins of cellular membrane altering permeability of microorganisms. However, more recently Diels et al. (2005) and (2006) identified fluid viscosity as a major environmental parameter affecting bacterial inactivation by UHPH.

No significant differences were observed in the lethality values of both strains between TSAYE and TASAYE + NaCl media within the same food matrix and inlet temperature indicating that the UHPH treatment caused no sublethal injuries. This was

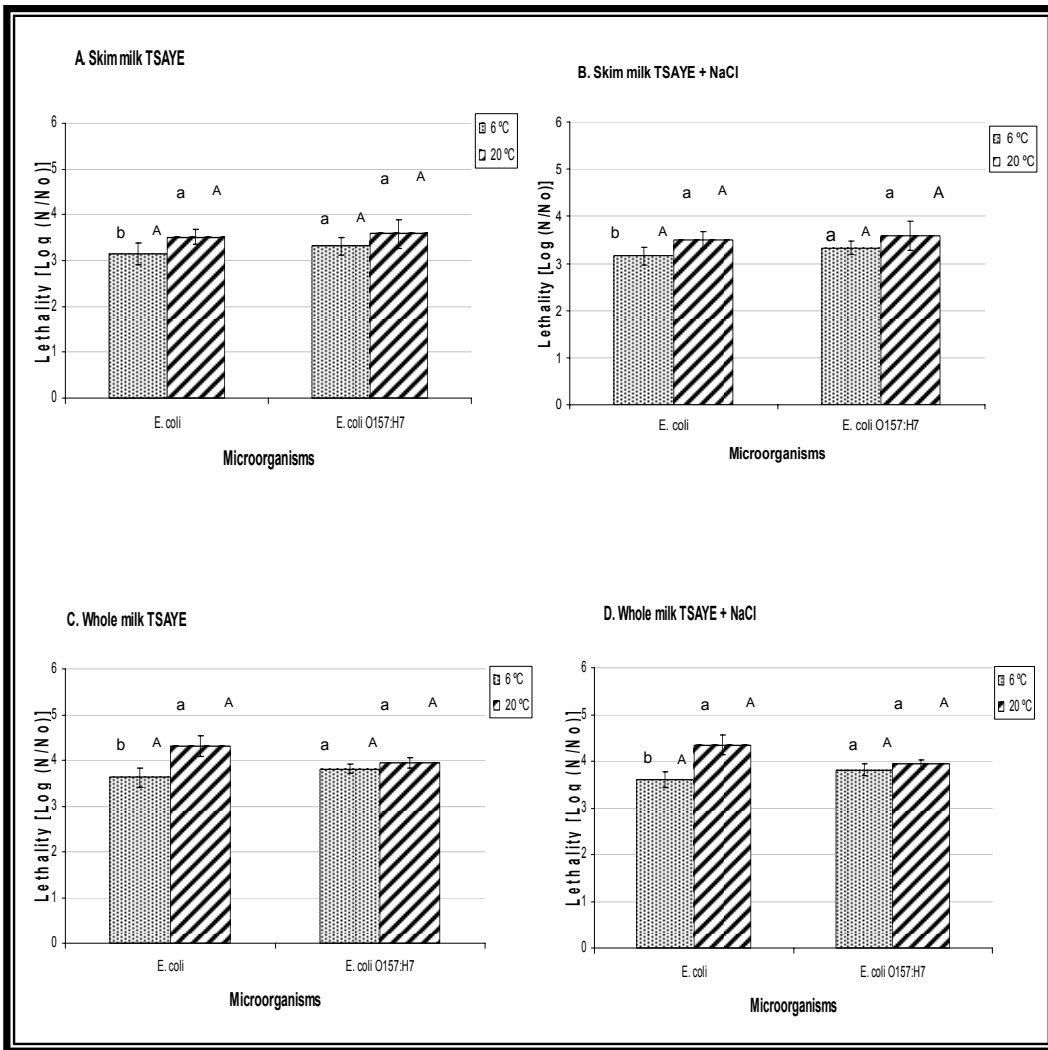
previously observed for other microorganisms such as *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (Wuytack et al., 2003; Wuytack et al., 2002). Wuytack et al. (2003) compared five different treatments, reporting that high levels of sublethal injuries were observed for high hydrostatic pressure and heat treatments compared to treatment with pulsed white light, pulsed electric field and UHPH which showed very low levels or even no sublethal injury. In a previous investigation by our group (Briñez et al., 2006b) we observed that UHPH treatment caused few or no sublethal injuries in *Listeria innocua* inoculated into whole milk and orange juice. This is the point that clearly makes the effect of this technology different from high hydrostatic pressure, which can cause accumulation of sublethal injuries leading to subsequent recovery of the cells, depending on the conditions of treatment and later storage (De lamo-castellví et al., 2005).

The evolution of cultivable cells of *E. coli* O157:H7 (CCUG 4485) during the later storage at 4 °C was similar in all samples, showing a slight but significant ( $P < 0.05$ ) decrease of approximately 0.3 logarithmic units between days 0 and 9 of storage. However, in the case of the strain ATCC 10536 their counts did not significantly differ during the whole storage.

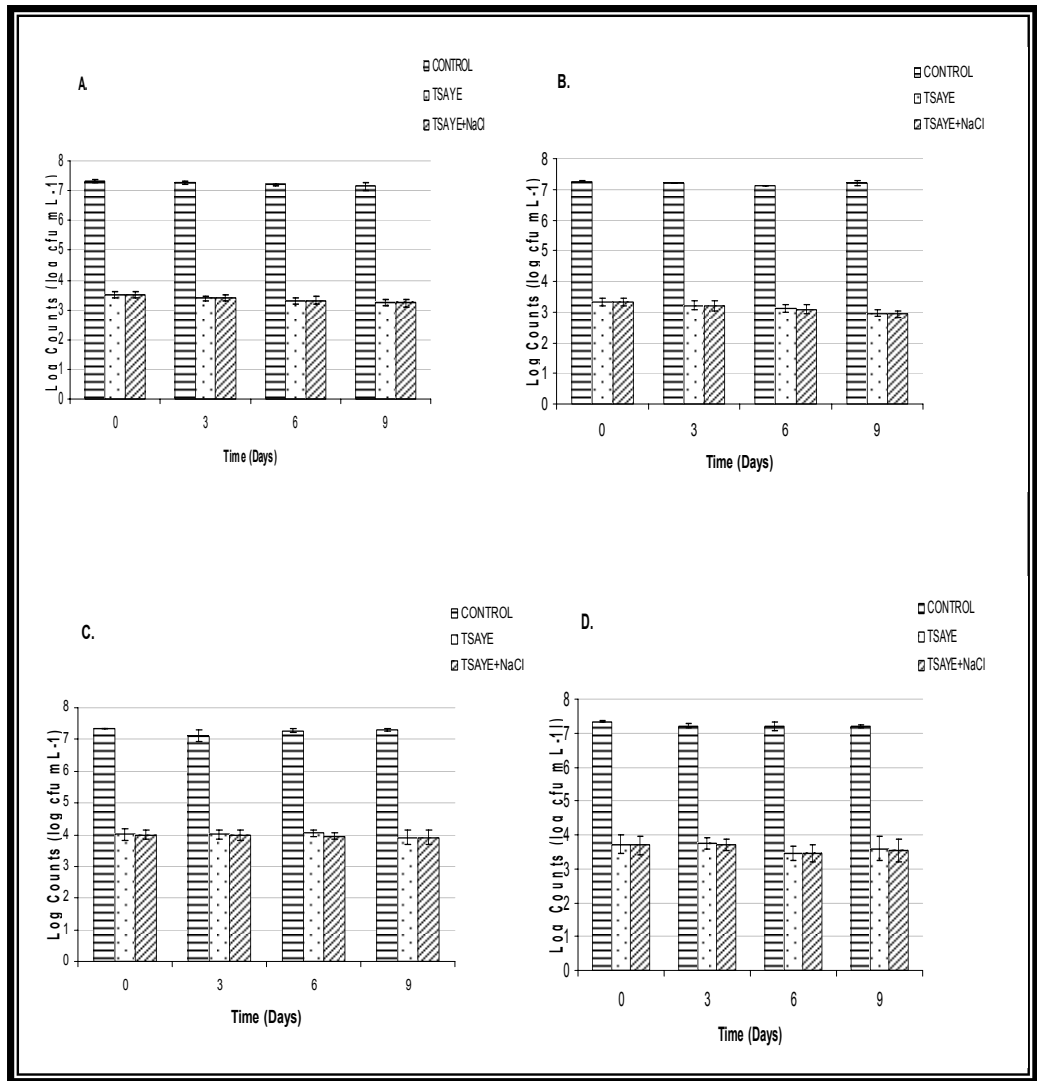
The low temperature of storage did not exert any significant effect on the behaviour of cultivable cells of *E. coli* O157:H7 in the treated samples, showing a similar evolution than the control samples. No other references were found about the evolution of *E. coli* treated by UHPH and stored at low temperatures. Vannini et al. (2004) reported an increment of the cultivable cells of *E. coli* of approximately 3.5 logarithmic units in skim milk after being treated at 130 MPa, but after 33 hours of incubation at 37 °C. In our work, the changes in cultivable cells remained steady or, in the case of *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 strain, showed a slightly decreasing tendency after 9 days of storage at 4 °C although the physical-chemical characteristics of milk (pH of 6.7 close to neutrality and a large presence of nutrients) are very favourable to this microorganisms. De Lamo-Castellví et al. (2005) reported that various strains of *Yersinia enterocolitica* were able to increase their counts in skim

milk about 8 Log<sub>10</sub> cycles after 15 days of storage at 8°C after being submitted to a high hydrostatic pressure treatment of 500 MPa that apparently caused its complete inactivation. *E. coli* is not a psychrotrophic bacterium and an increase in their counts in milk at 4 °C is not expected, but we could have expected a greater sensitivity of surviving cells to unfavourable growing conditions, such as low temperature. In previous studies (López-Pedemonte et al., 2005) we observed that *Staphylococcus aureus* decreased significantly their counts during cheese ripening after submitting the inoculated milk to a similar UHPH treatment prior to cheese elaboration, meanwhile in cheeses elaborated from untreated milk their counts remained steady along the ripening period. This indicated that although surviving cells can grow in culture media, they showed a greater sensibility to an unfavourable environment conditions (low pH and salt) than cells from the non-treated samples. If the cells that survive UHPH treatment are not injured, as was previously discussed, it can be supposed that they will not be more sensitive to unfavourable growing conditions, such as low temperature. In our trials, no significant differences were observed in cultivable cells between TSAYE and TASAYE + NaCl at any day of storage for samples at the same conditions and no differences were detected in the evolution of both strains between the treated ones and the controls, confirming that UHPH treatments did not increase the sensitivity of the cell to low temperatures of storage.

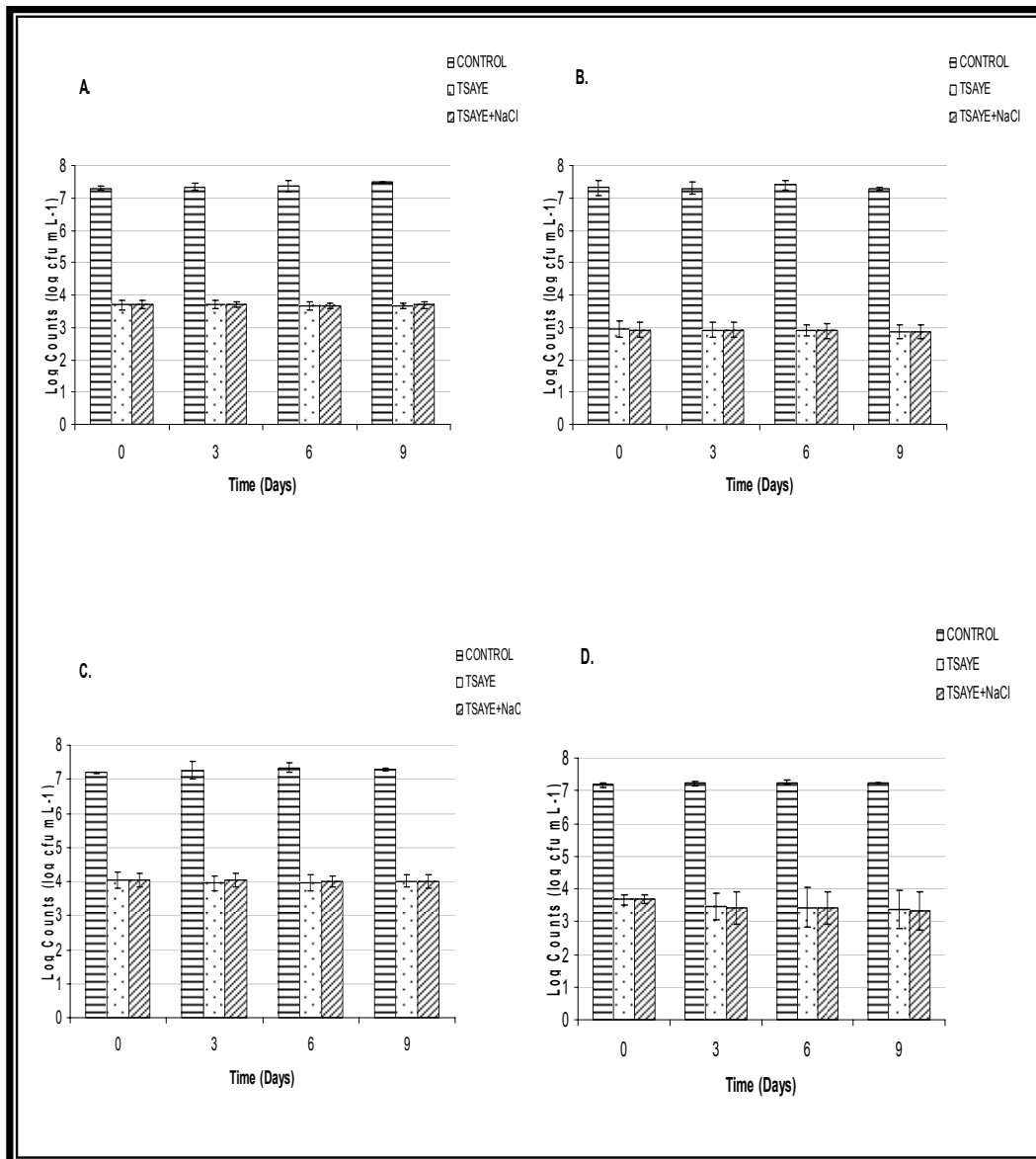




**Figure 1:** Inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 10536) and *Escherichia coli* O157:H7 (CCUG 44857), in skim (A, B) and whole milk (C, B) treated with ultrahigh-pressure homogenisation (300 + 30 MPa) using inlet temperature of 6 and 20 °C. Survivors were enumerated using tryptone soy agar with yeast extract (TSAYE) and TSAYE with 20 g/liter of salt added (TSAYE + NaCl) with incubation at 37 °C for 48 h. Bars with different superscript small letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same microorganism. Bars with different superscript capital letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same inlet temperature. Data are presented as the mean values of four replications  $\pm$  confidence intervals.



**Figure 2:** Changes in cultivable cells of *Escherichia coli* O157:H7 (CCUG 44857), in whole and skim milk pressurized at 300 + 30 MPa and stored at 4 °C. (A) Whole milk pressurized to inlet temperature of 6 °C. (B) Whole milk pressurized to inlet temperature of 20 °C. (C) Skim milk pressurized to inlet temperature of 6 °C. (D) Skim milk pressurized to inlet temperature of 20 °C. The data are presented as the mean value of four replications ± 95 % confidence interval.



**Figure 3:** Changes in cultivable cells of *Escherichia coli* (ATCC 10536), in whole and skim milk pressurized at 300 + 30 MPa and stored at 4 °C. (A) Whole milk pressurized to inlet temperature of 6 °C. (B) Whole milk pressurized to inlet temperature of 20 °C. (C) Skim milk pressurized to inlet temperature of 6 °C. (D) Skim milk pressurized to inlet temperature of 20 °C. The data are presented as the mean value of four replications  $\pm$  95 % confidence interval.

#### 4. Conclusions

The results indicate that even low inlet temperatures (6 and 20 °C) affect the lethality values in UHPH treatments only for *Escherichia coli* ATCC 10536 strain. These temperatures were efficient to reduce the cultivable cells whole and skim milk treated at 300 + 30 MPa, which is interesting since pre-heating milk implies an increase in the treatment costs. Pre-heating milk to higher temperatures would probably increase the lethality values after UHPH treatment. Fat content did not increase the resistance of the microorganism to UHPH, on the contrary, the presence of fat increased significantly the efficacy of the treatment and the further survival capability during the subsequent storage period of *E. coli*. The role of fat in the baro-resistance of microorganisms in comparison with heat treatments needs further research. Considering that UHPH treatment did not cause sublethal injuries, this technology may offer a promising alternative to the pasteurization of milk and other liquid foods supported on the possibility of increasing the inlet temperature of the sample before the process.

#### 5. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support received from the Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia Dels Aliments (CERPTA) by means of the CRAFT project 512626 UHPH, which permitted us to accomplish this research, and the grant given to Wilfredo José Briñez Zambrano by the Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) and Universidad del Zulia of Venezuela for Ph.D. studies.

#### 6. References

Altekruse, S. F., Timbo, B. B., Mowbray, J. C., Bean, N. H., Potter, M. E., Cheese-Associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992:

sanitary manufacture practices protect consumer, J. Food Prot. 61 (1998) 1405-1407.

Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., López-Pedemonte, T., Guamis, Buenaventura., Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*, Food Contr. 17 (2006a) 516-521.

Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero M. M., Guamis-López, Buenaventura., Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice using ultrahigh-pressure homogenisation, J. Food Prot. 69 (2006b) 89-92..

De Iamó-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X., Behaviour of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure, J. Food Prot. 68 (2005) 528-523.

Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., Michiels, C. W., Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity, Biotechno. Prog. 20 (2004) 1512-1517.

Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., Michiels, C. W., Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition, Int. J. Food Microbiol. 101(2005) 281-291.

- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., Michiels, C. W., Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures, *Int. J. Food Microbiol.* 87 (2003) 55-62.
- Gervilla, R., Ferragut, V., Guamis, B., High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents, *J. Dairy Sci.* 83 (2000) 674-682.
- Guerzoni, M. E., Vannini, L. Chaves López, C., Lanciotti, R., Suzzi, G., Gianotti, A., Effect of high pressure homogenisation on microbial and chemico-physical characteristics of goat chesses, *J. Dairy Sci.* 82 (1999) 851-862.
- Hayes, M. G., Kelly, A. L., High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties, *J. Dairy Resear.* 70 (2003) 297-305.
- Johnson, J. L., Rose, B. E., Sharar, A. K., Ramsom, G. M., Lattuada, C. P., Mcnamara, A. M., Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with food-borne disease outbreak, *J. Food Prot.* 58 (1995) 597-603.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., Fliss, I., Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese, *Int. Dairy J.* 12 (2002) 435-446.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., Guerzoni, M. E., Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenisation, *Lett. Appl. Microbiol.* 22 (1996) 165-168.

- López-Pedemonte, T., Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Guamis, B., Safety improvement of cheese inoculated with *Staphylococcus aureus* using ultra high pressure homogenising and high hydrostatic pressure. J. Food Prot. (2005) submitted.
- Lucore, L.A., Shellhammer, T. H., Yousef, A. E., Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing, J. Food Prot. 63 (2000) 662-664.
- Orden J. A., Cid, D., Ruiz-Santa- Quiteria, J. A., García, S., Martínez, S., De la Fuente, R., Verotoxin – producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain, J. Appl. Microbiol. 93 (2002) 29-35.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A., Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods, J. Food Prot. 58 (1995) 524-529.
- Popper, L., Knorr, D., Applications of high-pressure homogenisation for food preservation, Food Technol. 44 (1990) 84-89.
- Simmons, N. A., Global perspective on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* spp.: UK views, J. Food Prot. 60 (1997) 1463-1465.
- Sparling, P. H., *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks in the United States, 1982-1996, JAVMA, 213 (1998) 1733.
- Statistical Analysis Systems Institute, SAS. User's Guide. Version 8. Institute Inc.; Cary, NC: U.S.A, (1999).

- Tauxe, R. V. Emerging foodborne pathogens, *Int. J. Food Microbiol.* 78 (2002) 31-41.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L. Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., High-pressure of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation, *Int. Dairy J.* 13 (2003) 427-439.
- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., Fliss, I., Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure, *J. Food Prot.* 65 (2002) 345-352.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., Guerzoni, M. E. Interactions between high pressure homogenisation and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidasa, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 123-136.
- Wang, G., Zhao, T., Doyle, M. P., Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk, *J. Food Prot.* 60 (1997) 610-613.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., Michiels, C. W., Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure, *Int. J. Food Microbiol.* 77 (2002) 205-212.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. M. J., Michiels, C. W., Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments, *J. Food Prot.* 66 (2003) 31-37.



CAPÍTULO

SÉPTIMO

---

**Inactivation by Ultrahigh-pressure homogenisation of *Escherichia coli* strains inoculated in orange juice**

**Inactivación por ultra alta presión de homogeneización de cepas de *Escherichia coli* inoculadas en zumo de naranja**

Journal of Food Protection, (2006) Article in press

**Inactivation by Ultrahigh-pressure homogenisation of *Escherichia coli* strains inoculated in orange juice**

**Wilfido José Briñez, Artur X. Roig-Sagués\*, M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero, Buenaventura Guamis López**

*Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra (Barcelona) Spain*

**Abstract**

The aim of this work was to evaluate the efficacy of Ultrahigh-pressure homogenisation (UHPH) for inactivation and/or sublethal injury of two strains of *Escherichia coli* (*E. coli* O58:H21 ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857) inoculated into orange juice with pH of 3.6. The effects of orange juice inlet temperature (6 and 20 °C) on the lethality values and the capability of these strains for survival, repair, and growth during refrigerated storage after UHPH treatment also was evaluate. Samples of orange that had been treated with ultrahigh temperature were inoculated with *E. coli* in the stationary phase of growth until a final concentration of approximately 7.0 log CFU/ml was reached. These samples were then treated for one cycle with a double-valve UHPH machine, with 300 MPa on the primary homogenising valve and 30 MPa on the secondary valve. Counts of viable and injured bacterial cells were obtained for samples taken 2 h after UHPH treatment and after 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27, and 33 days of storage at 4 °C. The inlet temperature and the strain type both influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the lethality effect on *E. coli*, which was higher when the inlet temperature was 20 °C. No sublethal injuries were detected after any treatment. The change in viable counts over time for both strains in pressurized and control samples was similar. The viable counts remained high from the day 0 to day 18 and then tented to decrease. After 27 days storage at 4 °C, *E. coli* O157:H7 was more resistant in orange juice samples pressurised at inlet temperatures of 6 and 20 °C, with viable counts of 3.41 and 3.20 log<sub>10</sub> CFU/ml, respectively.

## 1. Introduction

Heat application is the physical preservation method most commonly chosen for perishable liquid foods. Thermal processing has a long tradition in food preservation because it is one of the most efficient and economical processes in achieving microbial inactivation. However, it is not the best adequate procedure for treating heat-labile compounds (Diels et al., 2005; Diels et al., 2003; Vachon et al., 2002). Consumer demand for fresh unpasteurized fruit juices has increased worldwide in recent years; consequently, many producers are reluctant to pasteurize their products because heat treatment is perceived as damaging to both the flavour and nutritional quality of fresh juice (McDonald et al., 2000; Splittstoesser et al., 1996). Orange juice is the most popular fruit drink consumed globally, and in the United States it represents approximately 60 % of all fruit juice consumed (Cook et al., 1998). For many year, fruit juices have been recognized as vehicles of foodborne diseases (19), but the increment of consumption of unpasteurized juice has raised the number of illness outbreaks associated with fruit juice in recent years (Cook et al., 1998; Paris, 1998). *Escherichia coli* O157:H7 has been blamed for some outbreaks caused by consumption of unpasteurized apple juice (Cody et al., 1999; Cook et al., 1998). Various strains of *E. coli* O157:H7 involved in these outbreaks were able to survive in highly acidic environments (pH 3.2 to 4.0) (Linton et al., 1999; Conner and Kotrola, 1995).

The growing demand for fresh food and high microbiological quality has generated a increased interest in emerging nonthermal processing technologies such as high hydrostatic pressure, pulsed electric field, ultraviolet light, ionizing radiation, pulsed light and ultrahigh-pressure homogenisation (UHPH) (Diels et al., 2005; Gervilla et al., 2000). High pressure treatments are considered to be the most promising of these new food-processing technologies because of the recent improvements in high-pressure machines and the introduction of pressure-processed foods (Kheadr et al., 2002; Lucore et al., 2000).

UHPH (also called dynamic high pressure) is based on the same design principles as the conventional homogenisation used in the dairy industry but involves higher pressures (> 100 MPa) (Hayes and Kelly, 2003; Thiebaud et al., 2003). UHPH has been used recently for the stabilization of liquid food mixtures and the recovery of cell proteins and other biochemicals from microorganisms after cell disintegration. Consequently, this technology is thought to lower the initial microbial load while minimizing the product damage caused by heat stress (Thiebaud et al., 2003; Popper and Knorr, 1990).

The effects of UHPH on bacterial cells are not well known, but microorganisms are probably disrupted by the sudden pressure drop, by torsion and shear stresses, and mostly by cavitation shock waves resulting from imploding gas bubbles. In the liquid, the collapse of such cavities could transmit several localized forces to the surfaces of particles, including the microbial cell (Guerzoni et al., 1999; Lanciotti et al., 1994; Popper and Knorr, 1990). Some research on UHPH has revealed changes in cell morphology and splits in the cytoplasmic membrane. Sudden increases in permeability and rupture of the cell membrane, such as may occur under pressure, cause cell death (Kheadr et al., 2002; Vachon et al., 2002).

Previous research on high hydrostatic pressure combined with storage at low pH and temperature has revealed the inactivation of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in orange juice and other fruit juices (Lim Teo et al., 2001; Linton et al., 1999). Pressure-injured cells of *E. coli* O157:H7 did not regenerate in low pH fruit juices incubated at 8 °C for up to 5 days (Linton et al., 1999). Although no references were found about the application of UHPH in juices, previous research (Diels et al., 2005; Thiebaud et al., 2003; Vachon et al., 2002) has demonstrated the effectiveness of this technology in reducing food-borne pathogens (including *E. coli*) in phosphate-buffered saline (PBS) and milk. Recent improvements in UHPH equipment now permit the processing of liquid foods at pressures above 300 MPa. One of the recent improvements in the design of UHPH homogenizers is a double-valve processing system that permits the

processing of samples at greater pressures and for fewer cycles to obtain satisfactory reductions.

The main objective of this work was to evaluate inactivation of two strains of *E. coli* inoculate into orange juice. The UHPH treatment was conducted with a double valve processing system (300 MPa at the primary homogenising valve and 30 MPa at the secondary valve) and a single cycle. We also studied the effect of orange juice inlet temperature and *E. coli* strain on the lethality and sublethal injuries measures. We also determined the ability of the two strains for survival, repair and grow under in refrigerated storage after UHPH treatment.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Bacterial strains and growth conditions*

*E. coli* O58:H21 (ATCC 10536) and *E. coli* O157:H7 (CCUG 44857) were obtained as freeze-dried cultures in thermosealed vials from the Spanish Type Culture Collection (University of Valencia, Valencia, Spain). Freeze-dried cultures were rehydrated in tryptone soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 37 °C for 18 h. Broths were then used to inoculate tryptone soy agar plate (Oxoid) and individual colonies were collected to prepare cryobeads (Nalgene System 100, Laboratories Microkit Iberica S.L., Madrid, Spain) of each strain, which were kept at -20 °C to provide stock cultures for the assays.

### *2.2. Preparation of cell suspension and inoculation into orange juice*

Before each experiment, one cryobead was inoculated into 10 ml of tryptone soy broth and incubated at 37 °C for 20 h. After incubation, the broth was spread with a disposable loop on tryptone soy agar slant and incubated at 37 °C for 20 to 24h. Subsequently, cell suspensions were prepared in 11 ml tryptone sodium chloride

solution (1 g of tryptone pancreatic casein and 8.5 g/liter sodium chloride) to obtain 9.0 to 9.5 log CFU/ml. Thereafter, 1 ml of cell suspension was used to determine the concentration based on spectrophotometer (Cecil 9000 series, Cecil instruments, Cambridge, UK) measurements of the optical density at 405 nm. Samples for tenting were obtained by adding 10 ml of this cell suspension to 1 liter of room-temperature orange juice that had been processed under ultrahigh temperature conditions. The final concentration of cells in orange juice was from 7.0 to 7.5 log CFU/ml. The inoculated samples were placed water bath at 6 and 20 °C for 70 min to reach pressurization temperature.

### *2.3. High-pressure treatment of orange juice*

The temperature-treated orange juice used in the trials was made from concentrated orange juice with less than 15 g/L sugar and pH 3.6. UHPH treatments were applied to orange juice samples with a high-pressure homogeniser (model/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). The flow rate of the juice in the homogenizer was constant (18 liter/h). This high-pressure machine contains a high-pressure valve made of ceramics that can support 350 MPa. The high-pressure systems (80 ml useful volume) driven by a hydraulic pump. To avoid poor homogenisation caused by temperature increase and rapid expansions or contractions in the first-stage valve, the valve is cooled by constant circulation of water at room temperature in an external jacket built around the valve. The samples of orange juice were subjected to a single cycle at UHPH of 300 and 30 MPa (300 MPa at the primary homogenising valve and 30 MPa at the secondary valve) at inlet temperatures of 6 and 20 °C. For the experiment, 2.0 litres of inoculated orange juice were used each strain, and the majority of this volume was processed through the homogeniser to ensure temperature equilibration. After treatment, 80 to 100 ml of orange juice was collected for analysis. The homogenised samples were rapidly cooled and reached an outlet temperature of 16.0 to 18.0 °C by means of: (i) an external jacket built around the

pipeline located between the first and second homogenizing valves and (ii) a spiral type heat exchanger (BCI/2843 type, Occo Cooler Ltd., Telford, UK) located after the second valve. The samples were immediately stored at 4 °C.

A specific sanitation programme for the high-pressure machine was developed. The machine was cleaned and disinfected immediately after the samples were treated by UHPH. The disinfectant agent used was a mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide (P3-Oxonia Active, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, Spain), a commercially available product intended for use in the food industry. For the development of this sanitation programme, previous evaluations were carried out to determine the bactericidal activity of the disinfectant based on a quantitative test of suspension (in vitro) (Briñez et al., 2006a). We also carried out several experiments to optimize the conditions of cleaning and disinfection in the high-pressure machine. The sanitation sequence of the machine was applied according to methodology developed by Briñez et al. (2006b).

#### *2.4. Microbiological analysis*

To determine the initial number of cells in the inoculated samples kept at 6 and 20 °C before UHPH, 1 ml of each sample of orange juice was used to prepare decimal dilutions in peptone water (Oxoid, 10 g/liter peptone and 5 g/liter NaCl; Oxoid). Subsequently, 1 ml of each dilutions were placed in duplicate in tryptone soy agar plate supplemented with 6 g/liter yeast extract (TSAYE; Oxoid) and incubated at 37 °C for 48 h. To determine the possible injury caused by low pH the orange juice samples were plated in duplicate on TSAYE supplemented with 20 g/liter NaCl (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) (20). Untreated inoculated samples (20 ml) were placed in sterile tubes and stored at 4 °C as controls and were included to determine the number of cells in untreated inoculated samples.

Microbiological analysis of treated samples and controls was performed 2 h after the UHPH treatment. The treated the orange juice samples were kept at 4 °C and

analyzed after 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27 and 33 days of storage. Decimal dilutions in peptone water of untreated and treated orange juice samples were prepared and plated in duplicate in TSAYE and TSAYE + NaCl (Patterson et al., 1995) and incubated at 37 °C for 48 h. The use of this differential planting technique enabled determination of number of injured cells. Both noninjured and injured cells were able to form colonies on TSAYE, whereas only noninjured cells formed colonies in the presence of NaCl (Patterson et al., 1995). Results were expressed as log CFU per milliliter. Lethality was calculated as  $\log N_0 - \log N$ , where  $N_0$  represents untreated samples and  $N$  represents treated samples.

### 2.5. Statistical analyses

All experiments were conducted four times with duplicate analysis in each replicate. Data are presented as least square means of each experiment. Analysis of variance was performed using the general lineal models procedure of the SAS<sup>®</sup> System (SAS, 1999). Least square means procedure were used for comparison of means. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

The inactivation of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 in orange juice by UHPH treatment at 6 and 20 °C is shown in Table 1. Both strain and inlet temperature of the sample significantly influenced ( $P < 0.05$ ) the degree of inactivation of these microorganism in orange juice. The results for both strains indicated that when the inlet temperature increased, the lethality values were higher. The highest lethality values were observed for *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 at an inlet temperature of 20 °C (3.87-log unit reduction). *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 was more resistant to UHPH treatment, showing the lowest values of lethality at 6 and 20 °C (3.38 and 3.68-log unit reduction). No significant differences were



observed in the counts obtained in either of the culture media used (TSAYE or TSAYE + NaCl) for any case, indicating that UHPH treatment did not cause sublethal injuries in the cells of either of the strains tested.

The change over time of viable counts of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 stored at 4 °C for 27 days is shown in Figure 1. When comparing the viable counts between days 0 and 27 of storage, significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed, with a decreasing tendency of approximately 3.0-log reduction over 27 days of storage. The change in viable counts for pressurized orange juice samples at both inlet temperatures (6 and 20 °C) as determined on both TSAYE and TSAYE + NaCl was similar. When comparing change of viable counts of *E. coli* between media for each day of storage of pressurized samples at the same inlet temperature, no significant differences were observed on any day, confirming that UHPH treatment did not affect the survivability of the strain tested. Storage temperature did not exert any significant effect on the viable counts of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 in orange juice, which was able to survive and maintain high viable counts of 3.1 and 3.7 log CFU/ml (at 20 and 6 °C respectively) under refrigerated storage for 18 days after UHPH treatment. The control samples were similar to the treated samples, but with less reduction over 27 days.

The counts of *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 in orange juice during 33 days of storage at 4°C are shown in Figure 2. This strain had higher viable counts than did *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 after 27 days of storage (3.20 and 3.41 log UFC/ml in TSAYE for samples pressurised at inlet temperatures of 20 and 6 °C, respectively). The viable counts in the two culture media for samples pressurized at the same inlet temperature did not differ during storage, although there was a decreasing tendency after 21 days. The change of viable counts on both media for pressurized samples at the two inlet temperatures was similar; counts diminished by approximately 3.0 log units from days 0 to 33. The count changes for control samples were similar to those for treated samples, but the viable counts were higher by approximately 1.0 log UFC/ml after 33 days of storage at 4°C.

#### 4. Discussion

Our study demonstrates the capacity of UHPH (300 and 30 MPa) to reduce counts of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 inoculated into orange juice, although there are significant differences in lethality between strains. An approximately 3.9-log units reduction in viable counts was obtained for *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 in orange juice with 300 and 30 MPa in a single cycle at an inlet temperature of 20 °C, whereas for *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 under the same temperature and pressure conditions only a 3.7-log reduction of viable counts was achieved.

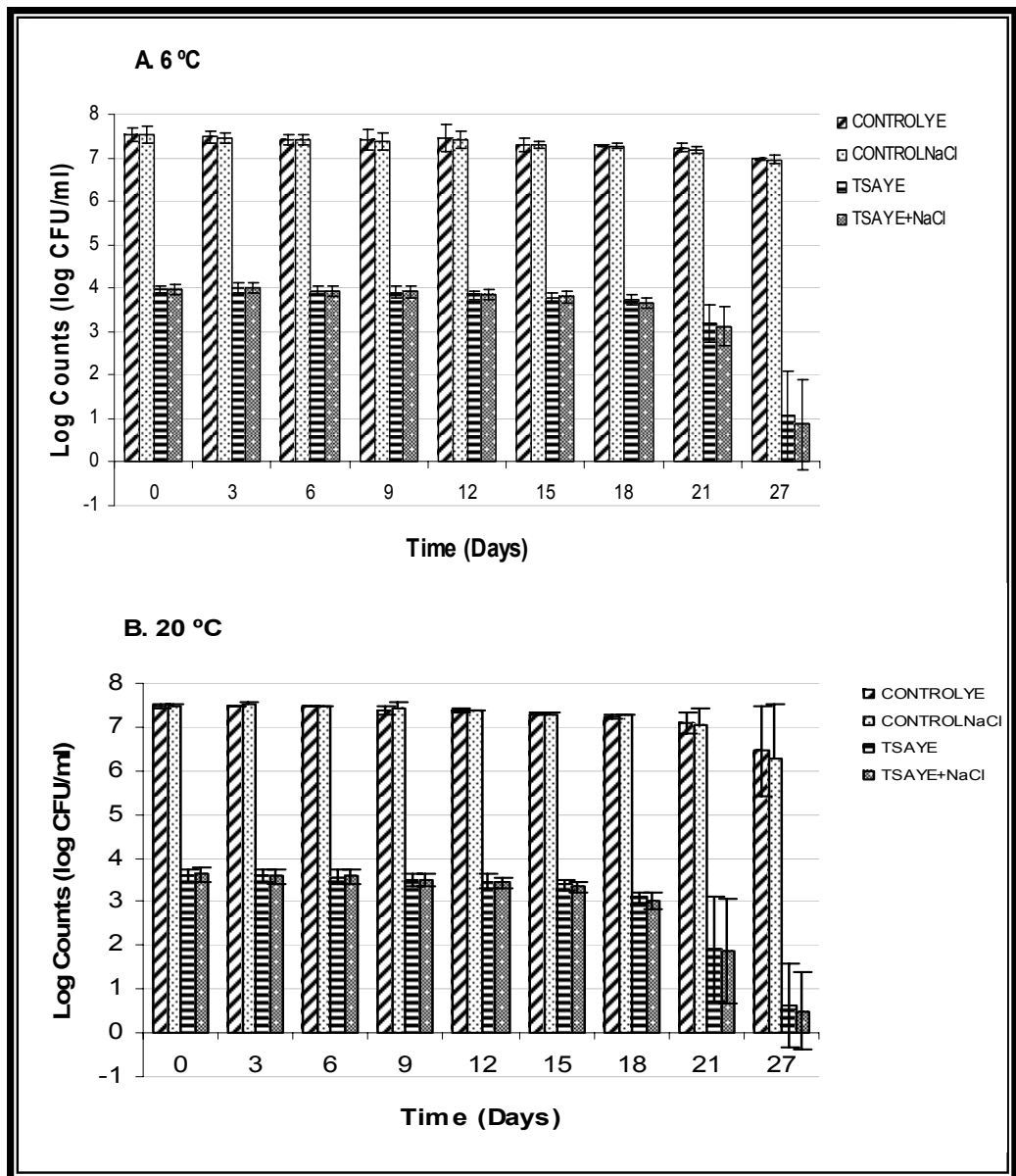
Although no previous references were found for orange juice (or fruit juices in general) treated with UHPH, similar reductions (3.5 log unit) have been reported by Diels et al. (2005) for *E. coli* MG1655 inoculated into skim milk and pressurised with one cycle at 300 MPa and an inlet temperature of 25 °C. In another study, the same researchers obtained approximately 3.5-log reductions in viable counts for *E. coli* MG1655 (Diels et al., 2004) and an inlet temperature of 5 °C and 4.5-log reductions at 20 °C when PBS was used as matrix. However, Vachon et al. (2002) reported slightly greater reductions (approximately 4.0 log units) for *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 inoculated into whole raw milk and PBS and pressurized for one cycle to just 200 MPa. In this case, the inlet temperature was 25 °C with the same model of high pressure machine employed by Diels et al. (2004) and Diels, et al. (2005) (Emusiflex C5, Avestin, Ottawa, Ontario, Canada). In the same investigation Vachon et al. (2002), preheating the milk (45, 55 and 60 °C) and PBS (45 and 55 °C) and studied the effect of this treatment on bacterial reduction, observing that lethal effect increased when the inlet temperature of food matrix was increased. Heating the milk to 60 °C brought an additional reduction of 1.2-log reduction in viable counts of *E. coli* O157:H7, compared with those samples pressurized at inlet temperature of 55 °C.

**Table 1**

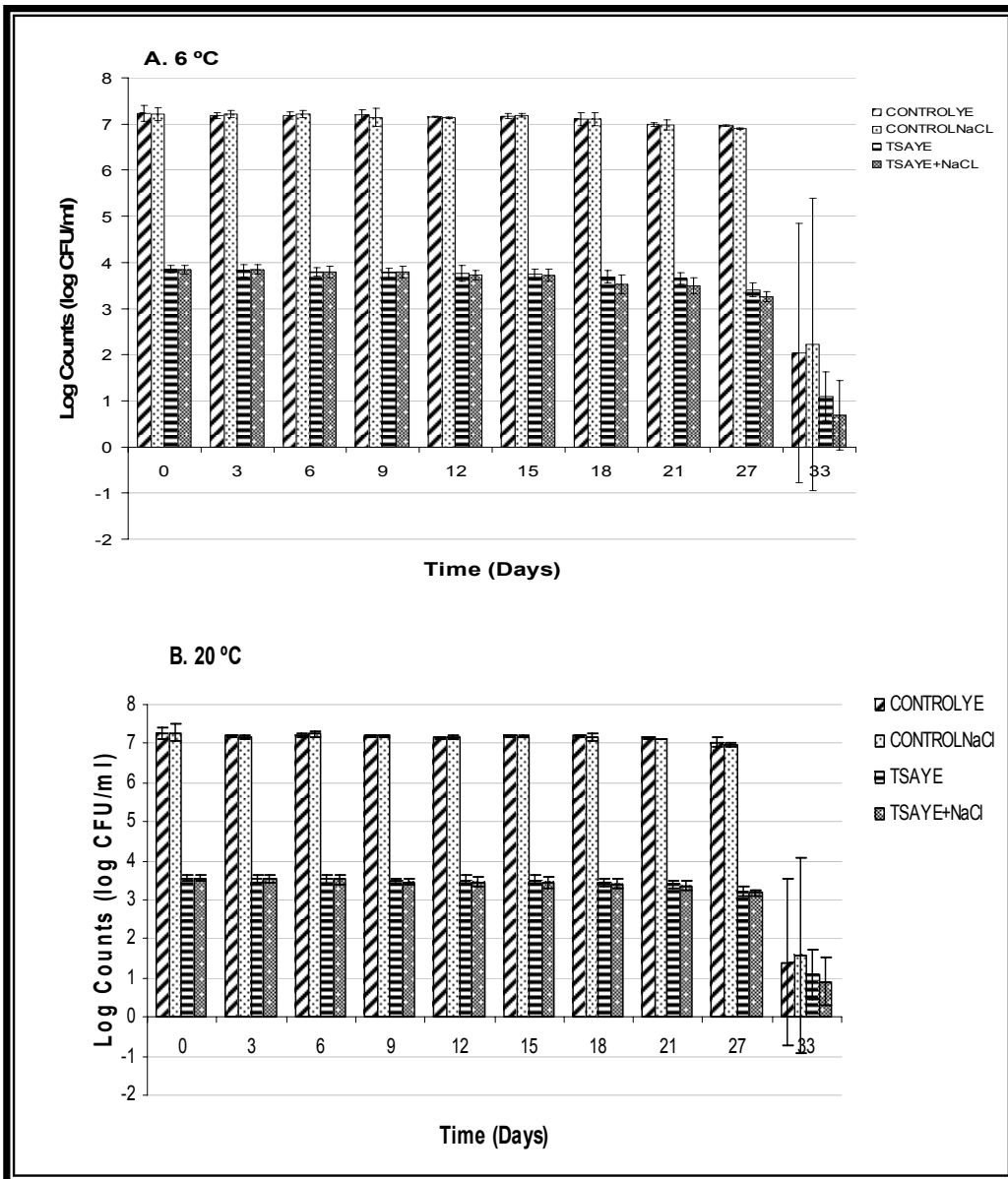
Log reduction of *E. coli* O157:H7 (CCUG 44857) and *E. coli* O58:H21 (ATCC 10536), inoculated into orange juice treated with ultrahigh-pressure homogenization (300 and 30 MPa) at inlet temperature of 6 and 20 °C.

Microorganism	Inlet temperature (°C)	Medium type (Least square means lethality values log <sub>10</sub> cfu mL <sup>-1</sup> )	
		TSAYE	TSAYE + 2% NaCl (w/v)
<i>E. coli</i> O157:H7 (CCUG 44857)	6	3.37 <sup>a</sup> <sup>A</sup> <sup>b</sup> ± 0.144	3.39 <sup>a</sup> <sup>A</sup> <sup>b</sup> ± 0.167
	20	3.69 <sup>b</sup> <sup>A</sup> <sup>b</sup> ± 0.134	3.68 <sup>b</sup> <sup>A</sup> <sup>b</sup> ± 0.120
<i>E. coli</i> O58:H21 (ATCC 10536)	6	3.57 <sup>a</sup> <sup>A</sup> <sup>a</sup> ± 0.092	3.57 <sup>a</sup> <sup>A</sup> <sup>a</sup> ± 0.132
	20	3.88 <sup>b</sup> <sup>A</sup> <sup>a</sup> ± 0.131	3.86 <sup>b</sup> <sup>A</sup> <sup>a</sup> ± 0.109

Data are the mean values of four replications ± confidence interval. Within columns, means with different lowercase letters (a and b) are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same strain and medium. Within rows, means with different small cap letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same strain and inlet temperature. Within columns, with different low-case italic letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same temperature and medium.



**Figure 1:** Change over time in viable counts of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 in orange juice pressurized at 300 and 30 MPa and stored at 4 °C. *E. coli* ATCC 10536 was inoculated into orange juice, which was then pressurized to inlet temperature of 6 °C (A) and 20 °C (B). The data are presented as the mean value of four replications  $\pm$  confidence interval.



**Figure 2:** Change over time in viable counts of *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 in orange juice pressurized at 300 and 30 MPa and stored at 4 °C. *E. coli* ATCC O157:H7 CCUG 44857 was inoculated into orange juice, which was then pressurized to inlet temperature of 6 °C (A) and 20 °C (B). The data are presented as the mean value of four replications ± confidence interval.

In our study, we also observed increased lethality with increased inlet temperatures, suggesting an effect of inlet temperature on lethality associated with the temperature reached by the sample when passing through the valve. The pressure and friction causes an increase in the temperature of the liquid, which may be depend on viscosity, the pressure applied, and the inlet temperature. However, this increase in temperature affects the sample for just a fraction of a second; after passing the valve the temperature decreases by approximately 16 °C because of both the decrease in pressure and the cooling system of the UHPH machine. Consequently, we may expect to achieve reductions greater than 4 log units if higher inlet temperatures are used. UHPH technology and increased inlet temperature of the sample may offer a promising alternative to the pasteurization of milk and others liquid foods, although studies are needed to determine how these conditions affect the organoleptical and nutritional properties of liquid food compared with the effects of pasteurisation.

The lack of significant differences between counts in the two culture media (TSAYE and TSAYE + NaCl) suggests that the UHPH treatments used caused insignificant sublethal injuries to *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857. Similar results were reported previously for *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium treated by UHPH in PBS (Wuytack et al., 2003; Wuytack et al., 2002). Additionally Wuytack et al. (2003). Wuytack et al. (2003) compared five different food preservation treatments and found the highest levels of sublethal injury for high hydrostatic pressure and for heat treatment compared with pulsed white light, pulsed electric field and UHPH, which produced the lowest level of sublethal injury. In previous studies carried out by our group, similar results were obtained for *Listeria innocua* inoculated into orange juice pressurized under similar conditions of pressure and temperature (Briñez et al., 2006b).

The effect of UHPH is clearly different from that high hydrostatic pressure, which has been extensively described as causing an accumulation of sublethal injuries in different microorganisms that may lead to subsequent recovery and growth of the

cells depending on the conditions of storage (De lamo-castellví et al., 2005; Patterson and Kilpatrick, 1998). If the cells that survive UHPH treatment are not injured, they probably will not be more sensitive to other treatments or to unfavourable growing conditions such as low pH or low temperature. In our trials, the microbiological results for orange juice treated by UHPH and stored at low temperature were similar to those for control samples. In both cases, no significant differences in viable counts were observed between culture grown on TSAYE and those grown on TASAYE + NaCl at any day of storage for samples processed at same inlet temperature. The UHPH consequently did not affect the survivability of the microorganisms at the low pH conditions of orange juice. The change over time of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857 was similar, with a slight decreasing tendency until the 27th day of storage and a greater decrease towards the 33rd day. No previous studies of change in viable counts over time were found for microorganisms inoculated into orange juice and treated with UHPH. Only references to similar works using high hydrostatic pressure were available. Linton et al. (1999) found that *E. coli* O157:H7 was capable of surviving for more than 26 days at pH 3.9 in orange juice stored at 3 °C after pressure treatment of 400 MPa. In that study, pressurization of *E. coli* O157:H7 at 400 MPa for 1 min at 10 °C resulted in only limited lethality (2.2-, 0.4-, 0.2-, and 0.1-log reductions at pH 3.4, 3.6, 3.9, 4.5 and 5.0, respectively) but it made the cells much more sensitive to high acid conditions during refrigerated storage. After 25 days of storage at pH 4.5 and 5.0, very little cell death occurred during the storage period (1.3 and 0.6 log units, respectively). In our study, both strains of *E. coli* were capable of surviving for more than 27 days at pH 3.6 in UHPH treated orange juice stored at 4 °C. Our results indicated that UHPH treatment did not increase the sensibility of these *E. coli* strains to acid conditions during storage at low temperature. In particular *E. coli* O157:H7 was able to survive for more than 33 days with counts of approximately 1.0 log CFU/ml.

## 5. Conclusions

UHPH treatments of orange juice at 300 and 30 MPa inlet temperatures of either 6 or 20 °C reduced viable counts of *E. coli* O58:H21 ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857. Lethality increased with inlet temperature, suggesting that greater reductions in viable cells counts would be obtained at higher inlet temperatures. Although efficacy of UHPH treatment was significantly different between strain, lethality was high for both strains and no sublethal injuries cells were found, indicating that UHPH technology and an increased inlet temperature may offer a promising alternative to the heat pasteurization of liquid foods. However, *E. coli* O157:H7 is capable of surviving in orange juice at low pH for more than 27 days at low temperature. Other treatments such as high hydrostatic pressure (Linton et al., 1999) and heat (Splittstoesser et al., 1996) made *E. coli* O157:H7 cells much more sensitive to high-acid conditions and incapable of surviving for many days in the juice after treatments.

## 6. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support received from the Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia Dels Aliments and the project 512626 “UHPH development and optimisation of a continuous Ultra High Pressure Homogeniser for application on milks and vegetable milks” and the grant given to Wilfido José Briñez Zambrano by the Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología and La Universidad del Zulia of Venezuela.

## 7. References

- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández Herrero, M. M., López-Pedemonte, T, and Guamis, Buenaventura. 2006. Bactericidal efficacy of peracetic acid in



combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. *Food Contr.* 17: 516-521.

Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernandez-Herrero, M. M, and Guamis-López, Buenaventura. 2006b. Inactivation of *Listeria innocua* inoculated into milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation. *J. Food Prot.* 69: 86-92.

Cody, S. H., Glynn, M. K., Farrar, J. A., Cairns, K. L., Griffin, P. M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., Arlene, S. K., Lewis, J. H., Swaminathan, B., Bryant, R. G, and Vugia, D. J. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection of unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Intern. Med.* 130: 202-209.

Conner, D. E, and Kotrola, J. S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 382-385.

Cook, K., Dodds, T., Hlady, W., Wells, J., Barret, T., Punr, N., Lancette, G., Bodager, D., Toth, B., Genese, C., Highsmith, A., Pilot, K., Finelli, L, and Swerdlow, D. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *JAMA.* 280: 1504-1509.

Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B, and Michels, C. W. 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. *Biotechnol. Prog.* 20: 1512-1517.

Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B, and Michels, C. W. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *Int. J. Food Microbiol.* 101: 281-291.

- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y, and Michels, C. W. 2003. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 55-62.
- De Iamò-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B, and Roig-Sagués, A. X. 2005. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* 68: 528-523.
- Gervilla, R., Ferragut, V, and Guamis, B. 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *J. Dairy Sci.* 83: 674-682.
- Guerzoni, M. E., Vannini, L. Chaves López, C., Lanciotti, R., Suzzi, G, and Gianotti, A. 1999. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat chesses. *J. Dairy Sci.* 82: 851-862.
- Hayes, M. G, and Kelly, A. L. 2003. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *J. Dairy Resear.* 70: 297-305.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P, and Fliss, I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12: 435-446.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M, and Guerzoni, M. E. 1994. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 165-168.

- Lim Teo, A. Y., Ravishankar, S, and Sizer, C. E. 2001. Effect of low-temperature, high-pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in unpasteurized fruit juices. *J. Food Prot.* 64: 1122-1127.
- Linton, M., McClements, J. M. J, and Patterson, M. F. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage in pressure-treated orange juice. *J. Food Prot.* 62: 1038-1040.
- Lucore, L.A., Shellhammer, T. H., & Yousef, A. E. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *J. Food Prot.* 63: 662-664.
- McDonald, C. J., Lloyd, S. W., Vitale, M. A., Petersson, K, and Innings, E. 2000. Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. *J. Food Sci.* 65: 984-989.
- Paris, M. E. 1998. Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in salmonellosis outbreak. *J. Food Prot.* 61: 280-284.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R, and Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J. Food Prot.* 58: 524-529.
- Patterson, M. F, and Kilpatrick, D.J. 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J. Food Prot.* 61: 432-436.

- Popper, L., and Knorr, D. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technol.* 44: 84-89.
- Splittstoesser, D. F., McLellan, M. R., and Churey, J. J. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Prot.* 59: 226-229.
- Statistical Analysis Systems Institute, SAS. (1999) User's Guide. Version 8. Institute Inc.; Cary, NC: U.S.A.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., and Cheftel, J. C. 2003. High-pressure of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* 13: 427-439.
- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., and Fliss, I. 2002. Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *J. Food Prot.* 65(2), 345-352.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J, and Michels, C. W. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 205-212.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. M. J, and Michels, C. W. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Prot.* 66: 31-37.

CAPÍTULO

OCTAVO

---

**Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20 °C**

**Inactivación de cepas de *Staphylococcus* spp. en leche entera y zumo de naranja usando ultra alta presión de homogeneización a temperaturas de entrada de 6 y 20 °C**

International Journal of Food Microbiology, (2006) submitted for publication

**Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20 °C**

**Wilfido José Briñez, Artur X. Roig-Sagués\*, M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero,  
Buenaventura Guamis López**

*Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra (Barcelona) Spain*

**Abstract**

The objective of this work was to evaluate the inactivation induced by ultra high pressure homogenisation (UHPH) of *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculated into milk and orange juice considering the effect of inlet temperature of the sample (6 and 20 °C) on the lethality values and on the production of sublethal injuries. Samples of UHT whole milk and UHT orange juice were inoculated at a concentration of approximately 7.0 log (CFU/ml) and pressurized with a dual valve UHPH machine at 300 MPa at the primary homogenising valve and at 30 MPa on the secondary valve. Viable and injured bacterial counts were measured two hours after UHPH treatment and after 3, 6, and 9 days of storage at 4 °C for milk, and after 3, 6, 9, 12, and 15 days of storage at 4 °C for orange juice. The inlet temperature, the food matrix and the kind of strain influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the lethality level, which was higher for *S. aureus* in whole milk at an inlet temperature of 20 °C. No sublethal injuries were detected after treatments. The change over time of viable counts for both strains showed a very strong decreasing tendency during the storage at 4 °C for orange juice, while the strain *S. carnosus* showed a low decreasing tendency and greater resistance when inoculated in milk and pressurized at 6 °C.

**Keywords** Ultra high pressure homogenisation; Milk; Orange juice; *Staphylococcus* spp.; sublethal injury

## **1. Introduction**

A broad spectrum of microbial pathogens can contaminate human food and cause illnesses after they or their toxins are consumed (Tauxe, 2002). Consumption of raw food has been suspected or confirmed worldwide as the most likely source of infection in diverse outbreaks which occurred during the last decade (Orden et al., 2002). The consumption of raw milk and dairy products elaborated with raw milk has been implicated in various countries with outbreaks caused by *Staphylococcus aureus* (De Buyser et al., 2001). Fruit juices have been recognized as vehicles of foodborne outbreaks since many years ago (Paris, 1998), but the increment of consumption of unpasteurized juice has caused a greater number of incidents associated with fruit juice in recent years (Cook et al., 1998; Paris, 1998). Although *Staphylococcus aureus* is not known to have caused outbreaks through consumption of fruit juice, it is able to resist acidic conditions and low pH in orange juice (Mothershaw and Jaffer, 2001).

Heat treatment is one of the most efficient and economical processes for achieving microbial inactivation in milk and other perishable liquid foods, but it cannot be used to treat heat-labile compounds. Furthermore, high temperatures may lead to undesirable effects in milk such as off-flavours, non-enzymatic browning and denaturation of certain vitamins and proteins (Diels et al., 2005; Diels et al., 2003; Vachon et al., 2002). In recent years, considerable research efforts have been directed towards the development of new non-thermal processes for food preservation, such as the use of high hydrostatic pressure, pulsed electric field, ultraviolet light, ionizing radiation, pulsed light and, more recently, ultrahigh-pressure homogenisation (UHPH) which is also called dynamic high pressure (Diels et al., 2005; Diels et al., 2004; Diels et al., 2003; Gervilla et al., 2000).

High pressure treatment is considered to be the most promising emerging food-processing technology due to recent improvements in high pressure machines and the introduction of pressure processed foods (Kheadr et al., 2002; Lucore et al., 2000). UHPH is a new alternative, based on conventional homogenisation in where the

movement of milk through the valve generates an increment of flow speed and a loss of pressure, bringing about cavitation, chisel effect, turbulence, and collision on the stationary surface that combine to reduce the size of the fat globule (1 to 10  $\mu\text{m}$ ) (Thiebaud et al., 2003; Hayes and Kelly, 2003; Vachon et al., 2002; Guerzoni et al., 1999). The effects of UHPH on bacterial cells are not well known yet, but microorganisms are disrupted probably by the sudden pressure drop by torsion and shear stresses, and most probably by cavitation shock waves resulting from imploding gas bubbles. In liquids, the collapse of such cavities could transmit several localized forces to surfaces of particles including the microbial cell (Guerzoni et al., 1999; Lanciotti et al., 1996; Popper and Knorr, 1990).

This new technology has recently been investigated for the stabilization of liquid food mixtures and for the recovery of cell proteins or other biochemicals from microorganisms, another use involves the destruction of large quantities of microorganisms by cell disintegration which permits extraction of the desired substances (Thiebaud et al., 2003; Popper and Knorr, 1990). Some research in UHPH has shown changes in cell morphology, as well as splits in the cytoplasmic membrane. Sudden increases in permeability or ruptures of the cell membrane, as may occur under pressure, cause cell death (Kheadr et al., 2002; Vachon et al., 2002). The UHPH treatment induces cell damage which increases with pressure level and number of cycles to which the sample was submitted (Vachon et al., 2002; Vannini et al., 2004).

*Staphylococcus aureus* proved to be one of the most resistant non-sporulated microorganisms to hydrostatic high pressure treatments (Gervilla et al., 2000). One study conducted by Wuytack et al. (2002) using *S. aureus* inoculated in phosphate buffer saline solution (PBS) showed that when the inlet temperature in the UHPH machine increased to 45 and 50 °C, reductions of 2 and 3 log units of were reached respectively. These researchers obtained very low reductions (0 at 0.5 log unit) for *S. aureus* inoculated in PBS after UHPH treatment at 25 °C with pressures between 100 and 300 MPa. *S. aureus* was significantly more resistant than *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Pseudomona fluorescens*.



Similar results were observed by Diels et al. (2003) who reported that UHPH treatment caused almost no inactivation of *S. aureus* at 35 °C and below, even with pressures of up to 300 MPa.

The recent improvements in UHPH equipment, such as the inclusion of a dual system valve that permits the processing of liquid foods to pressures above 300 MPa should help to obtain satisfactory reductions with smaller number of cycles. In this work, we intend to study the use of dual valve UHPH treatment with 300 MPa at the primary valve and 30 MPa at the secondary valve, to inactivate *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 inoculated into whole milk and into orange juice, considering the effect of inlet temperature of the sample in the machine on the lethality values and the production of sublethal injuries. We also determined the ability of these strains of *Staphylococcus* for survival, repair and growth in refrigerated storage after of UHPH treatment and, furthermore, the differences in the inactivation levels.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Bacterial strains used and growth conditions*

*S. aureus* ATCC 13565 and *S. carnosus* CECT 4491 were obtained as freeze-dried cultures in thermosealed vials from the Spanish Type Culture Collection (University of Valencia, Valencia, Spain). Freeze-dried cultures were rehydrated in tryptone soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) at 37 °C for 18 h. Subsequently, these broths were used to inoculate tryptone soy agar plate (Oxoid) and individual colonies were collected to prepare cryobeads (Nalgene® System 100™ Laboratories Microkit Iberica S.L., Madrid, Spain) of each strain. They were then kept at -20 °C to provide stock cultures for the assays.

### *2.2. Preparation of cell suspension and inoculation of whole milk and orange juice*

Prior to each experiment one cryobead was inoculated into 10 ml of tryptone soy broth (Oxoid) and incubated at 37 °C for 20 h. After incubation, the broth was spread using a disposable loop onto tryptone soy agar slant (Oxoid) incubated at 37 °C for 20-24h. Subsequently, cell suspensions were prepared in 11 ml tryptone sodium chloride solution (TSC) (1 g of tryptone pancreatic casein digestion and 8.5 g sodium chloride per litre) in order to obtain a concentration of  $9.0 \log_{10}$  CFU/ml to  $9.5 \log_{10}$  CFU/ml. Thereafter, 1 ml of cell suspension was used to determine the concentration by means of optical density at 405 nm using a spectrophotometer (Cecil 9000 series, Cecil instruments, Cambridge, England). Later, two samples of 10 ml of this cell suspension were inoculated in one litre of UHT whole milk and one litre of orange juice at room temperature. The final concentration of cells in the samples was of  $7.0 \log_{10}$  CFU/ml to  $7.5 \log_{10}$  CFU/ml. The milk and orange juice inoculated samples both were divided and were placed during 70 min at 6 and 20 °C in a water bath to reach pressurisation temperature.

### *2.3. High pressure treatment of inoculated samples*

UHPH treatments were applied to the milk and orange juice samples using a Stansted high pressure homogeniser (model/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). This high pressure machine comprises two intensifiers (80 ml useful volume), driven by a hydraulic pump, and a high pressure valve made of resistant ceramics able to support 350 MPa. It also has a second pneumatic valve able to support 50 MPa located after the first one. All these compounds guarantee a constant flow rate during the process ( $18 \text{ L h}^{-1}$ ). To avoid poor homogenisation performance due to temperature increase and rapid expansions or contractions in the first stage valve, the latter is cooled by constant circulation of water at ambient temperature in an external jacket built around the valve. The samples were subjected to a single cycle at UHPH of 300 MPa at the primary homogenising valve and 30 MPa at the secondary valve (300 + 30 MPa) at inlet temperatures of 6 and 20 °C. For the

experiment, 2.0 litres of each type of inoculated matrix were used, with the majority of this volume being processed through the homogeniser to ensure temperature equilibration. Afterwards, between 80 and 100 ml of the samples were taken for analysis. The homogenised samples reached an outlet temperature of 16.0 to 18.0 °C by means of: (i) an external jacket built around the pipeline located between the first and second homogenising valves and (ii) a spiral type heat-exchanger (BCI/2843 type, Occo Cooler Ltd., Telford, UK) located behind the second valve. The samples were immediately stored at 4 °C.

A specific sanitation programme developed for the UHPH machine was applied each time immediately after submitting the milk and orange juice samples to UHPH treatment. A mixture of peracetic acid and hydrogen peroxide (P3-Oxonia Active, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, Spain) was used as a disinfectant agent, whose bactericidal efficacy was previously evaluated using a quantitative test of suspension (Briñez et al., 2006a). We also carried out several experiments to adjust the conditions of cleaning and disinfection in the UHPH machine. The sanitation sequence of the machine was applied according to methodology developed by Briñez et al. (2006b).

#### *2.4. Microbiological analysis*

To determine the initial number of cells in the inoculated samples of milk and orange juice at 6 and 20 °C, 1 ml of each sample was used to prepare decimal dilutions in peptone water (Oxoid, 10 g/l peptone and 5 g/l NaCl). Subsequently, 1 ml of these dilutions were placed in duplicate in tryptone soy agar plate (Oxoid) supplemented with 6 g/l yeast extract (Oxoid, TSAYE) and incubated at 37 °C for 48 h. Additionally, to determine the possible injury caused by its low pH, the orange juice sample was plated in duplicate in TSAYE supplemented with 60 g/l of NaCl (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain; TSAYE + NaCl) (Patterson et al., 1995). Also, 20 ml of the

untreated inoculated samples (controls) were placed into sterile tubes and stored at 4 °C.

The first microbiological analysis of treated and control samples was performed 2 h after the UHPH treatment. Whole milk and orange juice samples were kept at 4 °C and analyzed after 3, 6 and 9 and after 3, 6, 9, 12, and 15 days of storage, respectively. To assess the lethality and the level of injuries caused by UHPH treatment, decimal dilutions in peptone water (Oxoid) of untreated and treated milk and orange juice samples were prepared and plated in duplicate in TSAYE and TSAYE + NaCl and incubated at 37 °C for 48 h. The use of this differential plating technique enables injuries to be monitored. Both noninjured and injured cells were able to form colonies on TSAYE, whereas only noninjured cells formed colonies in the presence of NaCl (Patterson et al., 1995). Results were expressed as the logarithm of CFU per ml. Lethality was calculated as the difference between the logarithms of colony counts of the untreated and treated samples ( $\log N_0 - \log N$ ).

#### 2.5. Statistical treatment of data

All experiments were repeated four times with duplicate analysis in each replicate. Data are presented as least square means of each experiment. Analysis of variance was performed using the General Lineal Models Procedure of SAS<sup>®</sup> System (SAS, 1999). Evaluation was based at a level of significance of  $P < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

In our study we compared the efficacy of UHPH treatment at inlet temperature of 6 and 20 °C in two different strains of *Staphylococcus* (Table 1) and we detected significant differences ( $P < 0.05$ ) between them. Both strains of *Staphylococcus* showed more resistance to the treatments at 6 °C in both food matrices and reached the highest lethality values in whole milk at 20 °C. The non-pathogenic strain *S. carnosus*

CECT 4491 showed a greater resistance to UHPH treatments when inoculated in whole milk and pressurized at inlet temperature of 6 °C. Similar behaviour was reported previously by Wuytack et al., (2002) for *S. aureus* inoculated in PBS after UHPH treatment between 100 and 300 MPa at 25 °C. Their research showed that *S. aureus* was significantly ( $P < 0.05$ ) more resistant than *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Pseudomonas fluorescens* in the same conditions. Also, similar resistance was shown in other research by Diels et al. (2003) for *S. aureus* inoculated in PBS pressurized between 100 and 300 MPa with inlet temperatures between 5 and 40 °C. On the contrary, Vannini et al., (2004) showed that *S. aureus* was more sensitive to the high pressure homogenization treatment (levels up to 130 MPa) than *Lactobacillus helveticus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. The differences in the lethality values seen between strains in previous studies from other authors and from our research group seem to indicate that the kind of strain used in tests of inactivation by UHPH may influence the results. The *S. carnosus* that showed the greater resistance to UHPH in our research could be used to value the efficacy of UHPH treatments in future trials and as a surrogate of other pathogenic strains which could diminish the risk of exposure to these microorganisms.

Both the inlet temperature of the sample and the kind of food matrix influenced significantly ( $P < 0.05$ ) the degree of inactivation of both *S. aureus* and *S. carnosus*. The results indicated that when the temperature increased, the lethality values were higher in both matrices, showing the highest lethality values for the strain *S. aureus* ATCC 13565 inoculated in whole milk at inlet temperature of 20 °C (4.0 log units). No information was found from previous studies about the effect of inlet temperature on the reduction of viable counts of *Staphylococcus* inoculated in whole milk and orange juice using UHPH treatments, but Diels et al. (2003) determined the effect of inlet temperature on the inactivation of *S. aureus* using PBS as matrix, observing that the lethal effect increased when the inlet temperature was increased. Heating of PBS samples to 45 and 50 °C brought an additional reduction of 2 and 3 log units, respectively. In a later study using *E. coli* the same researchers (Diels et al., 2004)

observed similar results, suggesting that the effect of the inlet temperature on bacterial inactivation can be explained by the decrease of the viscosity caused by an increase of temperature.

The results of our investigation suggest that for future evaluations, temperatures over 20 °C should be used to achieve reductions superior to 4 log units. These observations indicate that UHPH technology may offer a promising alternative to the pasteurization of milk, orange juice and other liquid foods. An inlet temperature of 6 °C could be applied for the milk industry since milk could be treated just after being unloaded from the containers without breaking the refrigeration conditions. Nevertheless, the apparent resistance shown by some strains of *Staphylococcus* and the 3 log units of reduction might not be sufficient depending on the quantitative and qualitative microbiological quality of raw milk. Other considerations, like enzyme inactivation (e.g. lipases) must also be taken into account in order to decide on the most adequate inlet temperature.

The lethality values reached were significantly higher in whole milk than in orange juice for both strains at an inlet temperature of 20 °C. The reductions in both matrices using an inlet temperature of 20 °C oscillated between 3.1 and 4.0 log units of reduction. No information has been found in previous research comparing the inactivation of *Staphylococcus* strains in whole milk and orange juice. However, in previous studies (Briñez et al., 2006b) differences were observed in the degree of inactivation of other microorganism such as *Listeria innocua*, when we pressurized at 300 + 30 MPa. Vachon et al. (2002) obtained different reductions in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* inoculated in PBS in comparison with the reductions reached in milk. These researchers obtained a reduction of approximately 6 log units in the counts of *L. monocytogenes* inoculated in PBS and of approximately 4 log units in milk after a single cycle UHPH treatment at 300 MPa with an inlet temperature of 25 °C. While *E. coli*, under the same conditions, showed reductions of approximately 6 log units and 8.5 log units for PBS and raw milk, respectively. It is important to point out that the UHPH treatment was more efficient against

*Staphylococcus* when it was applied in whole milk at 20 °C than in orange juice under the same conditions. This is in contrast with some observations made in different foods treated by high hydrostatic pressure, where the bacteria showed the highest sensitivity to the treatments at lower pH values (Ritz et al., 2000).

When comparing the lethality values of both strains between TSAYE and TASAYE + NaCl media within the same food matrix and using the same inlet temperature, no significant differences were observed, indicating that the UHPH treatment (300 + 30 MPa) caused few or no sublethal injuries in either *S. aureus* ATCC 13565 or *S. carnosus* CECT 4491. This is in accordance with Wuytack et al. (2002) who did not observe sublethal injuries in *S. aureus* inoculated into PBS after UHPH treatment. Also, the same research group showed in another study (Wuytack et al., 2003) that UHPH treatment caused few or no sublethal injuries in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* when it was inoculated in PBS and pressurised at 100 and 200 MPa with an inlet temperature of 25 °C. Moreover, in a previous investigation by our group (Briñez et al., 2006b) we observed that UHPH treatment apparently did not cause sublethal injuries in *Listeria innocua* inoculated into whole milk and orange juice. This is the point that clearly makes the effect of this technology different from high hydrostatic pressure, which can cause an accumulation of sublethal injuries leading to subsequent recovery of cells, depending on the conditions of treatment and later storage (De Lamo-Castellví et al., 2005a). Wuytack et al. (2003) compared five food preservation treatments where survivor microorganisms were enumerated using TSAYE and TSAYE + NaCl, reporting that the highest levels of sublethal injuries were observed for high hydrostatic pressure and heat treatments in comparison with pulsed white light, pulsed electric field and UHPH which showed the lowest level of sublethal injury.

The Change over time of viable counts of *S. aureus* ATCC 13565 in whole milk and orange juice pressurized at 300 + 30 MPa and stored at 4 °C is shown in Figure 1. The behaviour during the storage time of viable counts in whole milk and orange juice for pressurized samples at both inlet temperatures (6 and 20 °C) was clearly different.

**Table 1**

Effect of ultra high pressure homogenization treatment (300 + 30 MPa) on lethality values of *S. aureus* ATCC 13565 and *S. carnosus* 4491 CECT inoculated in whole milk and orange juice pressurized using inlet temperatures of 6 and 20 °C. Survivor were enumerated using tryptone soy agar with yeast extract (TSAYE) and TSAYE with 60 g/l of salt added (TSAYE + NaCl) with incubation at 37 °C for 48 h

Microorganism	Food Matrix	Medium type inlet temperature (Least square means lethality values log <sub>10</sub> CFU/ml)			
		TSAYE		TSAYE + NaCl 60 g/l	
		6	20	6	20
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	Milk	3.35 <sup>aB</sup> <sub>a</sub> ± 0.080	4.00 <sup>aA</sup> <sub>a</sub> ± 0.088	3.31 <sup>aB</sup> <sub>a</sub> ± 0.150	4.01 <sup>aA</sup> <sub>a</sub> ± 0.085
	Juice	2.83 <sup>bB</sup> <sub>a</sub> ± 0.192	3.16 <sup>bA</sup> <sub>a</sub> ± 0.153	2.82 <sup>bB</sup> <sub>a</sub> ± 0.177	3.13 <sup>bA</sup> <sub>a</sub> ± 0.152
<i>S. carnosus</i> CECT 4491	Milk	-0.01 <sup>bB</sup> <sub>b</sub> ± 0.042	3.34 <sup>aA</sup> <sub>b</sub> ± 0.388	0.00 <sup>bB</sup> <sub>b</sub> ± 0.004	3.63 <sup>aA</sup> <sub>b</sub> ± 0.338
	Juice	2.19 <sup>aB</sup> <sub>b</sub> ± 0.683	3.15 <sup>aA</sup> <sub>a</sub> ± 0.236	2.81 <sup>aA</sup> <sub>a</sub> ± 0.384	3.16 <sup>aA</sup> <sub>a</sub> ± 0.179

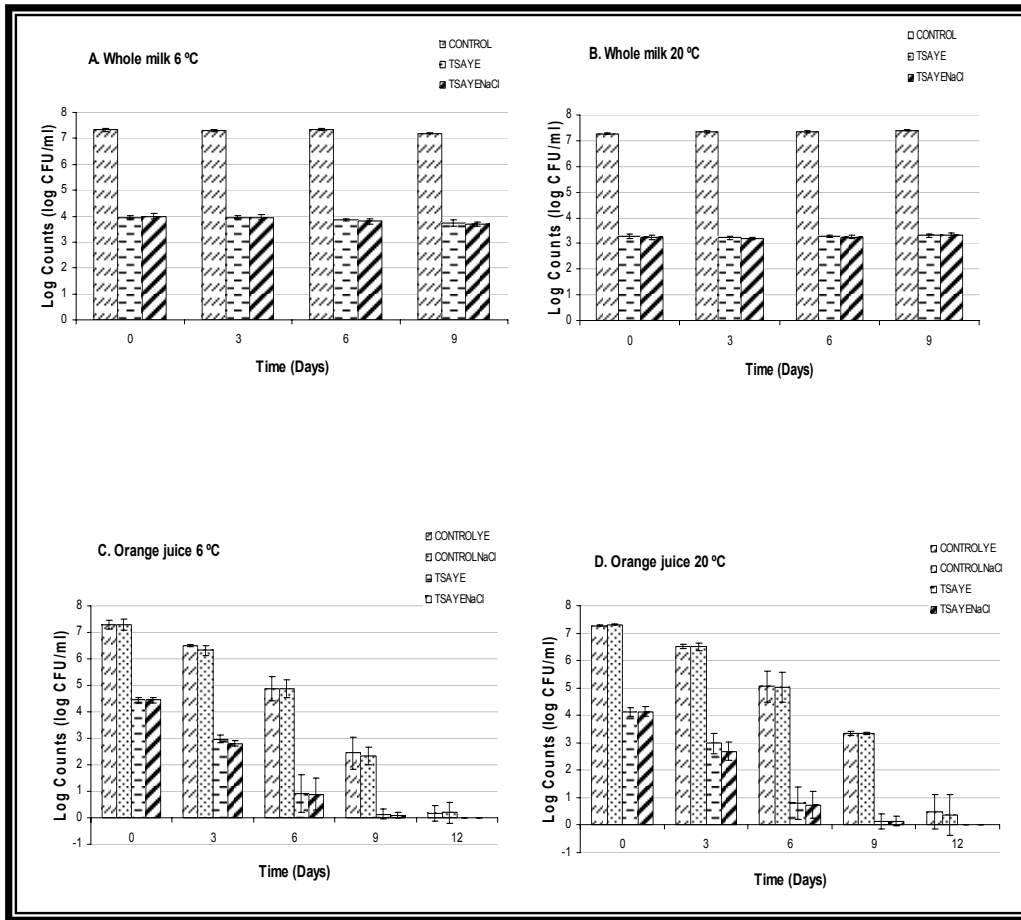
<sup>a,b</sup> Columns with different low-case letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same strain, media and inlet temperature.

<sup>A,B</sup> Rows with different superscript capital letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same strain, matrix and media.

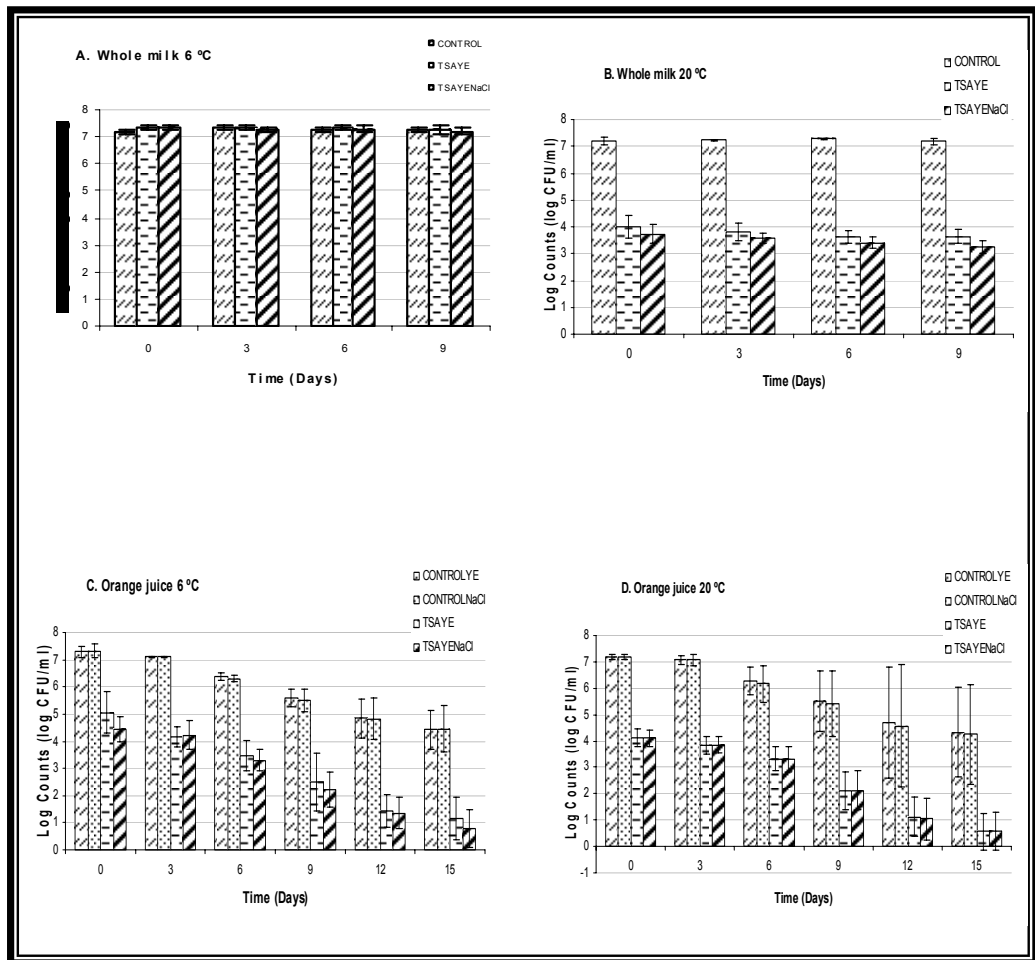
<sup>a,b</sup> Columns with different low-case italic letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) for the same food matrix, media and temperature.

Shown data are the mean values of four replications ± confidence interval.





**Figure 1:** Change over time of viable counts of *S. aureus* ATCC 13565 in whole milk and orange juice pressurized at 300 + 30 MPa and stored at 4 °C. (A and B) Whole milk pressurized with inlet temperatures of 6 °C and 20 °C, respectively. (C and D) Orange juice pressurized with inlet temperatures of 6 °C and 20 °C, respectively. The data are presented as the mean of four replications  $\pm$  confidence interval.



**Figure 2:** Change over time of viable counts of *S. carnosus* CECT 4491 in whole milk and orange juice pressurized at 300 + 30 MPa and stored at 4 °C. (A and B) Whole milk pressurized with inlet temperatures of 6 °C and 20 °C, respectively. (C and D) Orange juice pressurized with inlet temperatures of 6 °C and 20 °C, respectively. The data are presented as the mean of four replications  $\pm$  confidence interval.

The recounts in orange juice using TSAYE and TSAYE + NaCl showed a decreasing tendency of approximately 4.0 log units from days 0 to 9 of storage, while the viable counts in milk only showed a decrease of approximately 0.2 log units for pressurized samples. The low pH of orange juice (3.6) could have caused interferences in the change over time of the viable counts of *S. aureus* at low temperatures, making them decrease to very low levels by day 12. When comparing change of viable counts of *S. aureus* between TSAYE and TSAYE + NaCl media for each day of storage of pressurized samples at the same inlet temperature and matrix, no significant differences were observed at any day, confirming that UHPH treatment did not cause sublethal injury in the strain tested.

Similar results were observed in the change over time of *S. carnosus* CECT 4491 in whole milk and orange juice during storage at 4 °C for (Figure 2). The recounts in milk using TSAYE and TSAYE + NaCl mediums showed a low decreasing tendency of approximately 0.5 log units for pressurized samples at inlet temperature of 20 °C. The viable counts of *S. carnosus* in both matrices for pressurized samples at the same temperature and in both culture media did not significantly differ during storage at 4 °C. No statistical differences were observed between the treated and control samples in their evolution between culture media in any case which confirms that the treatment did not cause sublethal injuries on the *S. carnosus* CECT 4491 strain. In orange juice, both strains of *Staphylococcus* showed a low ability to survive and did not maintain high viable counts in refrigeration after UHPH treatment and 6 days of storage. The control samples showed a similar behaviour to the treated samples, but with a lower rate of reduction over 9 days.

This was probably due to the low pH (3.6) that may have caused interferences in the change over time of the viable counts of both strains of *Staphylococcus*, making them decrease to very low levels on day 15. On the other hand, *S. aureus* and *S. carnosus* are not psychrophilic bacteria and an increase in their counts is not expected in milk during storage, although the physicochemical characteristics of milk, pH close

to neutrality (6.7) and a large presence of nutrients could influence the survival of both stains after 9 days of storage at 4 °C.

In a study conducted by Vannini et al. (2004), an increment of the viable counts of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Lactobacillus plantarum* was reported in skimmed milk after a treatment at 130 MPa, with 33 hours of incubation at 37 °C. In another study De Lamo-Castellvi et al. (2005b) reported that various strains of *Yersinia enterocolitica* were able to increase their counts (8.0 log units) in skimmed milk after 15 days of storage at 8°C in samples submitted to a high hydrostatic pressure treatment of 500 MPa, which apparently caused their complete inactivation. If the cells that survive UHPH treatment are not injured, as was previously discussed, it can be supposed that they will not be more sensitive to unfavourable growing conditions, such as low temperature, than the non-treated. In our trials we did not observe significant differences in viable counts between TSAYE and TASAYE + NaCl at any day of storage for the same inlet temperature and matrix. No differences were detected in the change over time of both strains between the treated ones and the controls, suggesting that UHPH treatments did not increase the sensibility of the cell to low temperatures of storage.

#### 4. Conclusions

Our study demonstrated that UHPH treatments applied at 300 + 30 MPa in a single cycle were able to reduce significantly the counts of *S. aureus* ATCC 13565 and *S. carnosus* 4491 CECT inoculated in whole milk and orange juice, but the lethality value reached seems to depend on the inlet temperature, kind of matrix and the strain used. Inlet temperatures of 20 °C were efficient to reduce the viable counts in both strains inoculated in whole milk and orange juice by more than 3.1 log units. The strain *S. carnosus* 4491 CECT showed a greater resistance to UHPH treatments when inoculated in whole milk and pressurized with 6 °C inlet temperature. The highest lethality values caused by UHPH treatments were obtained in whole milk

during storage at 4 °C. A stronger decrease in the viable counts of both strain of *Staphylococcus* was observed in orange juice, while in milk the counts diminished slightly. UHPH treatment (300 + 30 MPa) did not cause sublethal injury in *S. aureus* and *S. carnosus* in any of the cases. UHPH technology may offer a promising alternative to the pasteurization of milk, orange juice and other liquid foods, combined with the possibility of increasing the inlet temperature of the sample before the process.

## 5. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support received from the “Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia Dels Aliments” (CERPTA) by means of the CRAFT project 512626 UHPH, which permitted us to accomplish this research and the grant given to Wilfido José Briñez Zambrano by the Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (FONACIT) and La Universidad del Zulia of Venezuela.

## 6. References

- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., López-Pedemonte, T., Guamis, Buenaventura., 2006. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. Food Control, 17, 516-521.
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero M. M., Guamis-López, Buenaventura., 2006. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation. Journal of Food Protection, 69, 86-92.

- Cook, K., Dodds, T., Hlady, W., Wells, J., Barret, T., Punr, N., Lancette, G., Bodager, D., Toth, B., Genese, C., Highsmith, A., Pilot, K., Finelli, L., Swerdlow, D., 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. The Journal of the American Medical Association, 280, 1504-1509.
- De Buyser, M-L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. International Journal of Food Microbiology, 67, 1-17.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., Michels, C. W., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. International Journal of Food Microbiology, 101, 281-291.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., Michels, C. W., 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. Biotechnology Progress, 20, 1512-1517.
- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., Michels, C. W., 2003. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. International Journal of Food Microbiology, 87, 55-62.
- De Iamò-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X., 2005a. Behaviour of *Yersinia*

*enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 68, 528-523.

De Iamó-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., and Roig-Sagués, A. X., 2005b. Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 337-342.

Gervilla, R., Ferragut, V., Guamis, B., 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 83, 674-682.

Guerzoni, M. E., Vannini, L., Chaves López, C., Lanciotti, R., Suzzi, G., Gianotti, A., 1999. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat chesses. *Journal of Dairy Science*, 82, 851-862.

Hayes, M. G., Kelly, A. L., 2003. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297-305.

Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., Fliss, I., 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12, 435-446.

Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., Guerzoni, M. E., 1996. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letter in Applied Microbiology*, 22, 165-168.

- Lucore, L.A., Shellhammer, T. H., Yousef, A. E., 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 63, 662-664.
- Mothershaw, A. S., Jaffer, T., 2001. Antimicrobial activity of foods with different physico-chemical characteristics. *International Journal of Food Properties*, 7, 629-638.
- Orden J. A., Cid, D., Ruiz-Santa- Quiteria J. A., García, S., Martínez, S., De la Fuente, R., 2002. Verotoxin – producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 29-35.
- Paris, M. E., 1998. Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in salmonellosis outbreak. *Journal of Food Protection*, 61, 280-284.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A., 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58, 524-529.
- Popper, L., Knorr, D., 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, 44, 84-89.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M., Federighi, M., 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiology*, 17, 375-382.



- Statistical Analysis Systems Institute, SAS. 1999. User's Guide. Version 8. Institute Inc.; Cary, NC: U.S.A.
- Tauxe, R. V., 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 31-41.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L. Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., 2003. High-pressure of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13, 427-439.
- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., Fliss, I., 2002. Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65, 345-352.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., Guerzoni, M. E., 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 123-136.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., Michels, C. W., 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 205-212.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. M. J., Michels, C. W., 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66, 31-37.

**CAPÍTULO**

**NOVENO**

---

**DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS**

## 1. VALORACIÓN DE LOS PROCESOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL EQUIPO DE UHPH

### 1.1. Eficacia bactericida del PAHP contra cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Listeria* y *Escherichia* en pruebas de suspensión

La efectividad de PAHP contra los diferentes microorganismos evaluados dependió de la concentración, del tiempo de exposición y, en menor grado, del tipo de materia orgánica empleada como sustancia interferente. El efecto del tipo de materia orgánica, tiempo de exposición y concentración de PAHP en la reducción decimal (DR) para cada grupo de microorganismos se muestra en las tablas 1, 2, y 3 (Capítulo IV). Las concentraciones de 0,3 y 0,4 % (v/v) mostraron valores de DR significativamente mayores en comparación con los de las concentraciones 0,1 y 0,2 %, las cuales a su vez mostraron valores más altos de DR que la concentración de 0,05 %. En general, el PAHP fue capaz de inactivar más de 5,0 log<sub>10</sub> CFU/mL de todos los microorganismos estudiados a concentraciones superiores de 0,1 % (v/v). Para las concentraciones entre 0,1 y 0,4 % (v/v), el tipo de materia orgánica empleada como interferente no ejerció ningún efecto significativo en el nivel de DR de las cepas estudiadas. En la concentración más baja de desinfectante (0,05 %) y en el menor tiempo de exposición (10 minutos), ambas cepas de *Staphylococcus* spp. mostraron una mayor resistencia al desinfectante que las cepas de *E. coli* y *Listeria* spp. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de DR entre las cepas de *Listeria* y *E. coli*. Por otra parte, tampoco se observaron diferencias en los valores de DR entre cepas patógenas y no patógenas para todos los géneros evaluados.

Algunos factores son conocidos por influenciar la actividad de los productos desinfectantes. Estos incluyen el tiempo de contacto con el microorganismo, la presencia de sustancias interferentes (orgánicas o inorgánicas), los efectos del tipo de formulación, la temperatura de contacto y la naturaleza y el tipo de microorganismo (Holah, 1995b). La sensibilidad que mostraron los microorganismos estudiados frente

al PAHP resulto muy diferente. La cepa de *S. carnosus* mostró ser la cepa más resistente al PAHP al presentar los valores mas bajos de DR (4,22 log<sub>10</sub> CFU/mL) con 10 minutos de tiempo de exposición y una concentración de 0,05 % del desinfectante.

La normativa Europea UNE-NE-1276 propone que, en las pruebas de suspensión usadas en la valoración de la eficacia de los productos desinfectantes, una DR de 5,0 log<sub>10</sub> (UFC/mL) de la carga bacteriana inicial es suficiente para considerar que un desinfectante tiene una buena actividad bactericida (Anónimo, 1998). Tomando en cuenta este criterio, se puede afirmar que el PAHP fue efectivo contra las cepas de *E. coli* y *Listeria* spp., que resultaron ser las mas sensibles, pero no contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus carnosus* a una concentración de 0.05 % (v/v) y 10 minutos de exposición. Resultados semejantes a esta investigación han sido observados en otros estudios (Frank y Chmielewski, 1997; Van de Weyer y col., 1993), donde se ha indicado la gran resistencia del *S. aureus* a la acción de diferentes productos desinfectantes basados en amonio cuaternario, cloro, aldehídos, formaldehídos, alcoholes y fenoles. Por otra parte, otras investigaciones (Park y col., 2004; Yu y col., 2001) han reportado la gran sensibilidad de *E. coli* O157:H7 y *Listeria* spp. frente a algunos agentes químicos, la cual se incrementa significativamente con la concentración del desinfectante. Otros estudios (Aarnisalo y col., 2000; Mullerat y col., 1995; Lee y Frank, 1991) también han reportado un incremento del nivel de inactivación de los microorganismos con el aumento de la concentración del producto desinfectante y el tiempo de exposición. En el presente estudio se observó un efecto similar, con un aumento significativo de la DR al incrementar el porcentaje de desinfectante añadido, hasta alcanzar una concentración de 0,3 % (v/v) y un tiempo de exposición de 20 minutos.

En el presente trabajo, la albúmina bovina, recomendada como sustancia interferente por el protocolo para la valoración de desinfectantes en la prueba de suspensión de la normativa Europea UNE-EN-1276 (Anónimo, 1998), fue remplazada por soluciones al 1,0 % (v/v) de leche semi-desnatada, zumo de naranja, huevo liquido y batido de chocolate, con la intención de simular las condiciones de interferencia que

se pueden encontrar en la práctica a nivel de la industria alimentaria. El huevo líquido fue la materia orgánica que mostró la mayor capacidad interferente sobre la actividad bactericida del PAHP a bajas concentraciones (0,05 %) y corto periodo de tiempo (10 minutos), probablemente debido a que esta matriz presenta en su constitución gran cantidad de proteínas y grasas, que pueden hacer mayor su capacidad interferente. En contraste, el zumo de naranja mostró la menor capacidad interferente entre las sustancias evaluadas. No obstante, ninguna de las sustancias interferentes evaluadas redujo la efectividad global del PAHP, el cual fue capaz de reducir más de  $5 \log_{10}$  CFU/mL de todos los microorganismos estudiados, a excepción del género *Staphylococcus* al 0,05 % de concentración y 10 minutos de exposición. Estos resultados confirman que la capacidad interferente puede depender de la naturaleza de la materia orgánica empleada en las pruebas de la actividad del desinfectante.

Ninguna información ha sido encontrada en estudios previos referente al uso de diferentes tipos de materias orgánicas en pruebas de suspensión para simular las condiciones prácticas encontradas en la industria alimentaria, y más específicamente, donde se estudie la eficacia del PAHP frente a estas sustancias interferentes. Algunas investigaciones (Mullerat y col., 1995; Van de Weyer y col., 1993) han indicado que un aumento del nivel de proteína adicionada es capaz de reducir significativamente la actividad bactericida del producto desinfectante. Se cree que los desinfectantes son absorbidos por los sólidos en suspensión o reaccionan con la suciedad y, por lo tanto, pueden ser inactivados o neutralizados (Holah, 1995b). Los resultados mostrados en este trabajo justifican la utilización de diferentes tipos de sustancias interferentes para tratar de simular las condiciones prácticas encontradas en la industria alimentaria, en la evaluación de la eficacia de los productos desinfectantes. Por consiguiente, para asegurar la actividad del desinfectante aplicado, es de suma importancia realizar una limpieza previa en forma regular y constante de todos los equipos empleados en el procesamiento de los alimentos, con el fin de reducir al mínimo la actividad interferente e incrementar el número de microorganismos reducidos por el desinfectante en estas superficies (Luppens y col., 2002; Taormina y Beuchat, 2002).

La fase 3 de valoración de los productos desinfectantes dentro de la Unión Europea representa una gran dificultad, debido a la regulación de la normativa UNE-EN-1276 (Anónimo, 1998), la cual demanda el uso en sus evaluaciones de microorganismos patógenos. Sin embargo, el uso de microorganismos patógenos está restringido a laboratorios que trabajen en condiciones de seguridad estrictamente controladas, condiciones difíciles de establecer en una industria alimentaria. Este hecho nos ha limitado para poder probar la eficacia de los desinfectantes in situ (Anónimo, 1990). Esta es la razón por lo que es muy importante la búsqueda de microorganismos sucedáneos no patógenos, que muestren resistencias a los desinfectantes semejantes a sus homólogos patógenos, y que puedan ser empleados en las valoraciones de los productos desinfectantes en las mismas condiciones de aplicación de estos productos a nivel industrial.

Cuando comparamos las cepas dentro del mismo género, no se observaron diferencias significativas en los valores de DR entre cepas patógenas y no patógenas. Este hecho indica que las reducciones para cepas dentro del mismo género son similares pero diferentes entre especies. Por lo tanto, es razonable sustituir *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* por cepas no patógenas del mismo género en la evaluación de productos desinfectantes, para evitar la introducción de microorganismos patógenos en la planta de procesamiento, que quizás contaminen el alimento producido, y por otro lado, para reducir el riesgo de exposición de los trabajadores a estos agentes infecciosos.

## **1.2. Eficacia bactericida del PAHP contra cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Listeria* y *Escherichia* en la máquina de UHPH**

No se han encontrado datos en estudios previos referente al desarrollo de un procedimiento de limpieza y desinfección adaptado a los equipos UHPH. Las pocas investigaciones disponibles actualmente no describen el procedimiento de limpieza y desinfección aplicado a la máquina de UHPH para garantizar la idoneidad de los

resultados entre una replica y otra de los experimentos. Sin embargo, en un estudio conducido por Wuytack y col. (2002), se indica que la desinfección del equipo de UHPH (Avestin, Emulsiflex C5) se realizó utilizando etanol al 70 % (v/v), el cual fue aplicado al homogeneizador después de la aplicación de cada ciclo de tratamiento. El Emulsiflex C5 es un equipo muy pequeño, que tiene una capacidad máxima de 1 a 5 litros/hora dependiendo del nivel de presión aplicado, por lo que para garantizar la desinfección de un equipo de estas características puede ser factible y adecuado la utilización de etanol al 70 %; Pero este procedimiento de desinfección no parece muy adecuado para equipos con mayor capacidad y de aplicación industrial.

El *S. carnosus* resultó ser la cepa más resistente al PAPH en las pruebas de suspensión, por lo que para realizar las evaluaciones preliminares sobre la máquina de UHPH se utilizó leche entera inoculada con esta cepa. Para alcanzar el objetivo de ajustar un proceso de limpieza y desinfección adaptado a las características particulares de la máquina de UHPH, se ensayaron diferentes condiciones de aplicación del PAHP sobre el equipo, variando condiciones de concentración del producto (entre 0,5 a 2,5 % v/v), temperatura del agua de aclarado, temperatura del agua de dilución del desinfectante y jabón, y tiempo de exposición al desinfectante (Tabla 5). La descripción del procedimiento de limpieza y desinfección ajustado a la máquina de UHPH resultante de todas las evaluaciones se muestra en los capítulos III y V de este trabajo.

**Tabla 5.** Efecto de la concentración de PAHP, tiempo de exposición, temperatura del agua y concentración de jabón en la eliminación de la microbiota en un equipo de UHPH.

PAHP % (v/v)	N	T° Agua dilución PAHP (°C)	Exposición PAHP (minutos)	T° agua aclarado (°C)	Jabón % (v/v)	Recuentos UFC/filtro (700 ml)
0,5	1	TA	20	TA	2,5	> 300
0,5	1	TA	40	TA	2,5	> 300
1,0	1	TA	40	TA	2,5	> 300
1,0	1	TA	60	TA	2,5	> 300
1,5	2	TA	60	TA	2,5	> 300
1,5	2	TA	90	TA	2,5	> 300
2,0	2	42	90	70	2,5	> 300
2,0	4	42	120	70	5,0	<100
2,5	6	42	90	70	5,0	< 20
2,5	24*	42	120	70	5,0	< 10

TA: Agua a temperatura ambiente

\* Corresponde a 4 replicas para cada uno de los microorganismos.

Durante el procedimiento de ajuste del proceso de limpieza y desinfección sobre la máquina de UHPH, las concentraciones de desinfectante entre 0,5 a 1,5 % (v/v) mostraron recuentos superiores a 300 UFC/filtro, independientemente del tiempo de exposición, temperatura del agua y concentración de la solución jabonosa. Cuando se incremento la concentración del desinfectante al 2,0 % (v/v) y el tiempo de retención del desinfectante en el interior de la máquina de UHPH de 90 a 120 minutos, combinado con una concentración de solución jabonosa del 5 % (v/v) para el lavado, se logro reducir los recuestos por debajo de 100 UFC/filtro. La concentración de 2,5 % (v/v) de PAHP mostró recuentos inferiores a 20 UFC/filtro cuando el desinfectante se



diluyo con un agua destilada estéril a 42 °C, se mantuvo en el interior de la máquina por 90 minutos, y se aclaro con agua destilada estéril a 70 °C, habiendo realizando un lavado previo de la máquina con solución jabonosa a una concentración de 5 % (v/v).

En general, el PAPH fue capaz de reducir la carga microbiana de la máquina de UHPH por debajo de 10 UFC/filtro a la concentración de 2,5 % con un tiempo de exposición de 120 minutos, independientemente del tipo de matriz y del microorganismo presurizados en la máquina de UHPH. Los resultados mostrados en este trabajo indican que las concentraciones que son efectivas contra algunas cepas bacterianas en las pruebas de suspensión empleadas para la comprobación de la eficacia de los desinfectantes, no son efectivas cuando se aplican en superficies de equipos usados para el procesamiento de alimentos (UHPH), quizás debido a que las células bacterianas, cuando se encuentran adheridas a la superficie de los equipos, suelen disponerse en forma de capas lo que reduce la efectividad de los productos desinfectantes (Fatemi y Frank, 1999; Frank y Chmielewski, 1997). Por otra parte, Frank y Koffi, (1990) han demostrado en sus estudios que los microorganismos unidos a superficies inertes, como las de los equipos utilizados para el procesamiento de alimentos, son menos sensibles a los desinfectantes que sus contra partes vivos y libres, como suele ocurrir en las pruebas de suspensión. Además, investigaciones más recientes (Mosteller y Bishop, 1993; Ronner y Wong, 1993), referentes a la inactivación de microorganismos adheridos a superficies usando varios tipos de materiales que incluían acero inoxidable, caucho, poliéster y/o poliuretano y teflón, demostraron que el tipo de superficie a la cual se encuentran unidos los microorganismos influencia significativamente la eficacia de los productos desinfectantes.

El tiempo de contacto del desinfectante con los microorganismos es conocido como uno de los principales factores capaces de influenciar la actividad de los productos desinfectantes (Brunis y Dyer, 1995; Holah, 1995a; Holah, 1995b). En este trabajo cuando el tiempo de contacto se incremento de 90 a 120 minutos (concentración 2,5 %), los recuentos disminuyeron de < 20 a < 10 UFC/filtro, lo que

indica un bajo número de colonias en 700 mL de volumen total de agua recolectada al final del procedimiento de higienización. Estos resultados confirman que el tiempo de contacto del desinfectante con las superficies del equipo de UHPH conteniendo las cepas bacterianas evaluadas, puede influenciar la actividad del PAHP. Un tiempo de contacto suficiente con la célula es, por lo tanto, requerido, y es un punto crítico para asegurar la desinfección y alcanzar el propósito general de la mayoría de los desinfectantes, que es reducir la población bacteriana en el orden de 5 unidades logarítmicas en 5 minutos de contacto en una prueba de suspensión (Holah, 1995a; Holah, 1995b). Por otro lado, el tiempo de aplicación está directamente relacionado con la concentración de desinfectante aplicada. Por lo general, cuando se utilizan concentraciones bajas los tiempos de contacto suelen ser mayores y viceversa (Herruzo, 2000).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se obtuvo un procedimiento de limpieza y desinfección que garantizó la idoneidad de los resultados entre las repeticiones en cada uno de los experimentos con una concentración de PAHP de 2,5 % (v/v), diluido en un agua destilada estéril a 42 °C, con un tiempo de exposición de 120 minutos y una concentración de jabón del 5 %, y todo esto aclarado con agua destilada estéril a 70 °C (Tabla 5).

## **2. EVALUACIÓN DE LA INACTIVACIÓN CAUSADA POR LA UHPH EN CEPAS BACTERIANAS INOCULADAS EN LECHE Y ZUMO DE NARANJA**

### **2.1. Inactivación de *L. innocua*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. carnosus* y *S. aureus* en leche y zumo de naranja usando UHPH**

Este estudio demuestra la capacidad de la UHPH de reducir los recuentos de los diferentes microorganismos estudiados en leche entera, desnatada y zumo de naranja. La inactivación de *L. innocua* ATCC 33090, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, *S. carnosus* CECT 4491 y *S. aureus* ATCC 13565 por tratamientos de

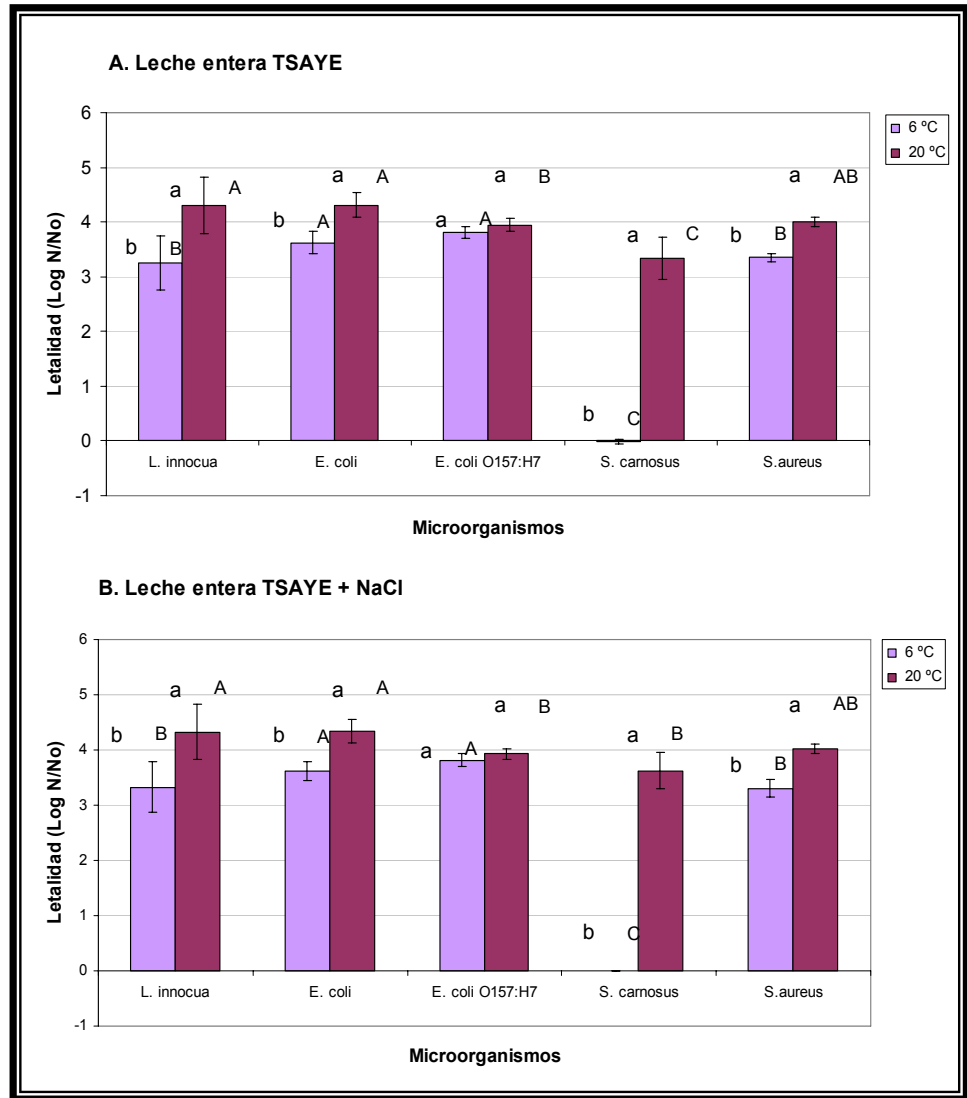
UHPH a 300 + 30 MPa, usando un único pase y temperaturas de entrada de 6 y 20 °C en leche entera y zumo de naranja se muestra en las figuras 7 y 8. La aplicación de UHPH en leche y zumo de naranja presentó un comportamiento que, en general, condujo a una reducción aceptable de los recuentos en las muestras presurizadas, y que como mínimo fue alrededor 3,0 log<sub>10</sub> UFC/mL en todos los casos, a excepción de *S. carnosus* a 6 °C, que resulto ser muy resistente bajo estas condiciones de estudio.

### **2.1.1. Efectos del tipo de microorganismo en al inactivación de cepas bacterianas tratadas por UHPH**

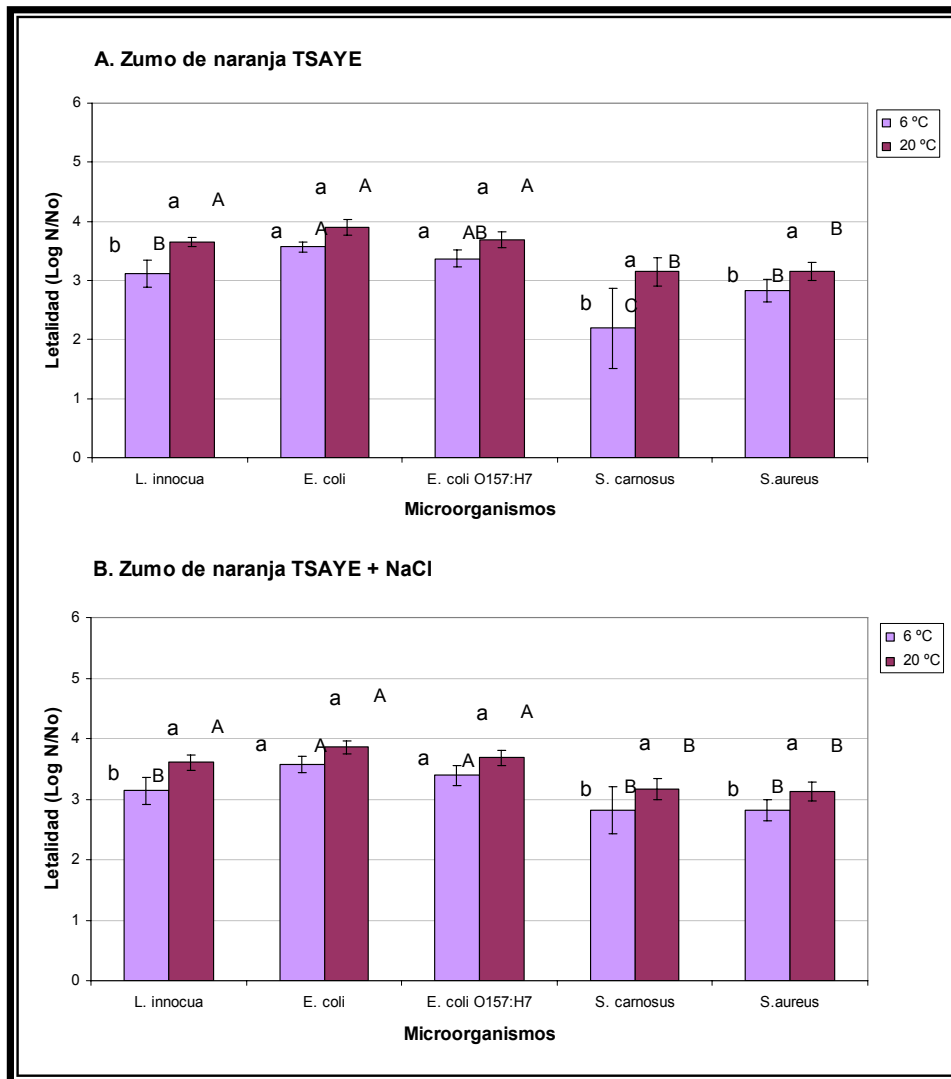
Los tratamientos de UHPH no mostraron la misma eficacia contra todas las cepas probadas, observándose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los valores de letalidad entre las cepas cuando se aplicó el tratamiento en la misma matriz y a la misma temperatura de entrada. En general, las cepas de *E. coli* y *L. innocua* fueron las más sensibles, mientras que *S. carnosus* fue la cepa mas resistente a la UHPH, sobre todo cuando el tratamiento se aplicó a una temperatura de entrada de 6 °C. Similar compartimiento fue reportado previamente por Wuytack y col. (2002) en *S. aureus* inoculado en PBS después de tratamientos de UHPH entre 100 y 300 MPa a 25 °C. Los investigadores reportaron que *S. aureus* fue significativamente ( $P < 0,05$ ) más resistente que *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomona fluorescens* en las mismas condiciones de tratamiento. También, se observaron resistencias similares en otra investigación realizada por Diels y col. (2003), con *S. aureus* inoculado en PBS presurizado entre 100 y 300 MPa y con temperaturas de entrada entre 5 y 40 °C. Por el contrario, Vannini et al. (2004), reportaron en su investigación que el *S. aureus* fue más sensible a la presión de homogenización (niveles hasta 130 MPa) que *Lactobacillus helveticus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. La cepa no-patógena *S. carnosus* CECT 4491, que mostró una gran resistencia a la UHPH, podría ser usada para valorar la eficacia de los tratamientos de UHPH en futuros ensayos como sustituto de otras cepas patógenas del

mismo género, disminuyendo el riesgo de exposición de los trabajadores a estos microorganismos.

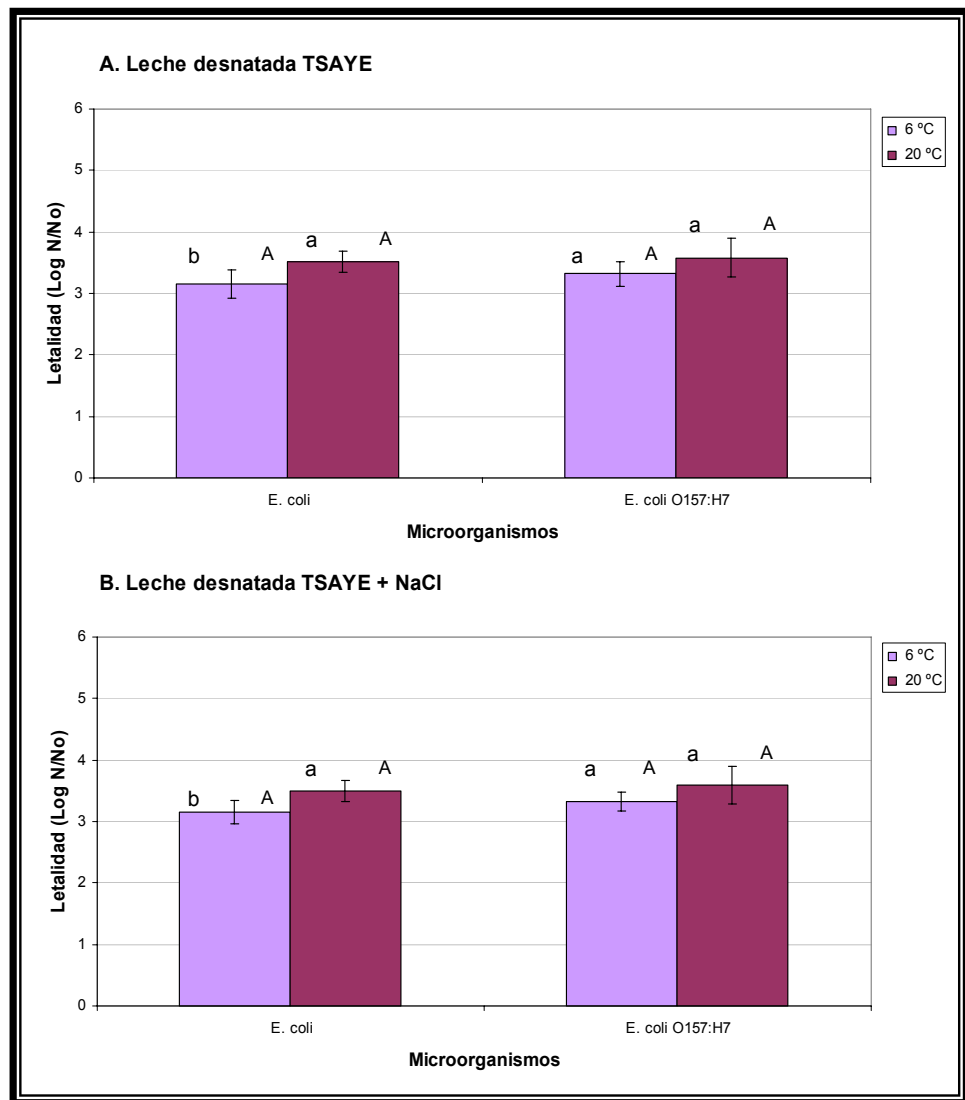
Los mayores valores de letalidad en este trabajo fueron obtenidos para las cepas *L. innocua* ATCC 33090 y *E. coli* ATCC 10536, inoculadas en leche entera y presurizadas a una temperatura de entrada de 20 °C ( $4,30 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>). Kheadr y col. (2002), han descrito en uno de sus estudios reducciones de 4,0 unidades logarítmicas con la misma cepa de *Listeria* evaluada en este trabajo (*L. innocua* ATCC 33090), inoculada en leche desnatada y en leche con el 2 % de grasa, pero con la diferencia que para alcanzar estas reducciones en sus estudios fue necesario presurizar las muestras inoculadas con 5 pases a 200 MPa y a una temperatura de entrada de 28 °C. Reducciones similares (4,0 unidades logarítmicas) han sido descritas por Vachon y col. (2002) para *Listeria monocytogenes* inoculada en leche cruda y presurizada a 300 MPa, pero usando 3 pases con el mismo modelo de máquina de UHPH empleado por Kheadr y col. (2002) (Avestin, Emulsiflex-C160), mientras que solo observaron reducciones inferiores a 1,0 unidad logarítmica tras un solo pase a 300 MPa, reducciones mucho menores a las observadas en nuestro estudio en la mismas condiciones, aunque usando otra máquina de UHPH (*Stansted*, DRG FPG7400H:350).



**Figura 7:** Inactivación de *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 y *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 en leche entera tratada por UHPH (300 + 30 MPa), usando temperaturas de entrada de 6 y 20 °C. Los sobrevivientes fueron enumerados usando agar triptona soja con extracto de levadura (TSAYE) y TSAYE con 20, 30 y 60 g/litro de sal adicionada (TSAYE + NaCl). Barras correspondientes al mismo microorganismo pero con diferentes letras minúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Barras correspondientes a la misma temperatura de entrada pero con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Los datos son presentados como medias de cuatro replicas  $\pm$  intervalos de confianza.



**Figura 8:** Inactivación de *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 y *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 en zumo de naranja tratado por UHPH (300 + 30 MPa), usando temperaturas de entrada de 6 y 20 °C. Los sobrevivientes fueron enumerados usando agar triptona soja con extracto de levadura (TSAYE) y TSAYE con 20, 30 y 60 g/litro de sal adicionada (TSAYE + NaCl). Barras correspondientes a el mismo microorganismo pero con diferentes letras minúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Barras correspondientes a la misma temperatura de entrada pero con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Los datos son presentados como medias de cuatro replicas  $\pm$  intervalos de confianza.



**Figura 9:** Inactivación de *Escherichia coli* ATCC 10536 y *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 en leche desnatada tratada por UHPH (300 + 30 MPa), usando temperaturas de entrada de 6 y 20 °C. Los sobrevivientes fueron enumerados usando agar triptona soja con extracto de levadura (TSAYE) y TSAYE con 20, 30 y 60 g/litro de sal adicionada (TSAYE + NaCl). Barras correspondientes al mismo microorganismo pero con diferentes letras minúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Barras correspondientes a la misma temperatura de entrada pero con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Los datos son presentados como medias de cuatro replicas  $\pm$  intervalos de confianza.

Reducciones de 3,5 unidades logarítmicas han sido reportadas por Diels y col. (2005), para *E. coli* MG1655 en leche desnatada presurizada a 300 MPa con un solo pase, pero con temperaturas de entrada ligeramente superiores (25 °C). Sin embargo, Vachon y col. (2002), reportaron reducciones muy diferentes, de hasta 8,0 unidades logarítmicas, para otra cepa de *E. coli* (*E. coli* O157:H7 ATCC 35150) inoculada en leche cruda entera y presurizada a 300 MPa, con una temperatura de entrada de 25 °C, usando el mismo modelo de máquina empleado por Diels y col. (2005), (Avestin, Emusiflex C5). En este trabajo, sin embargo, no se encontraron estas diferencias significativas entre ambas cepas de *E. coli*, pero si entre cepas de diferentes géneros. A diferencia de los resultados obtenidos para el género *E. coli*, las cepas de *Staphylococcus* si mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los valores de letalidad entre ellas. Ambas cepas de *Staphylococcus* fueron más resistentes a bajas temperaturas en leche y zumo de naranja. Las diferencias en los niveles de inactivación entre cepas observadas en investigaciones previas y en este trabajo parecen confirmar claramente que el tipo de la cepa empleada en las pruebas para valorar la inactivación por UHPH pueden influenciar los resultados.

### **2.1.2. Efectos de la temperatura de entrada y tipo de matriz en la inactivación de cepas bacterianas tratadas por UHPH**

La sensibilidad mostrada por las cepas inoculadas en leche entera, desnatada y zumo de naranja, presurizadas a las temperaturas de entrada de 6 y 20 °C fue diferente. La temperatura de entrada en la máquina de UHPH y el tipo de matriz influenciaron significativamente ( $P < 0,05$ ) el grado de inactivación alcanzado por las cepas evaluadas en este estudio (Figuras 7, 8 y 9). Los resultados en este trabajo indican que, cuando la temperatura se incrementó, las letalidades alcanzadas fueron mayores para todas las cepas y en todas las matrices. Un comportamiento semejante fue reportado previamente por Vachon y col. (2002), quienes determinaron el efecto del precalentamiento de la leche (45, 55 y 60 °C), previo a la aplicación de la UHPH, en la



reducción bacteriana, observando claramente que el efecto letal se incrementaba con el aumento de esta temperatura. El calentamiento de la leche a 60 °C produjo una reducción adicional de 1,5 y 1,2 unidades logarítmicas en los recuentos de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, respectivamente, en comparación a las muestras que entraron a 55 °C. Similar comportamiento ha sido mostrado en otro estudio (Diels y col, 2004) para *E. coli* inoculada en PBS y presurizada usando UHPH, en donde los autores reportan que el nivel de inactivación bacteriana se incremento con la temperatura de entrada (5, 20, 25, 35, 45 y 50 °C). Diels y col. (2004) sugieren que el efecto de la temperatura de entrada en la inactivación bacteriana puede ser explicado por un descenso de la viscosidad del líquido, causado a su vez por un incremento de la temperatura. Este mismo grupo de investigación (Diels y col., 2003) mostró en otro de sus estudios el efecto de la temperatura de entrada en la inactivación de *S. aureus*, usando PBS como matriz. Los investigadores observaron el mismo comportamiento, al incrementarse el nivel de inactivación con la temperatura. Un calentamiento previo de las muestras de PBS, justo antes del tratamiento, a 45 y 50 °C, causo una inactivación adicional de 2,0 y 3,0 unidades logarítmicas.

No se ha encontrado ninguna información en estudios de UHPH referente al efecto sobre la reducción de los recuentos viables de *L. innocua*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. carnosus* y *S. aureus*, a las mismas temperaturas de entrada usadas en el presente trabajo (6 y 20 °C). Sin embargo, en esta investigación también se observo un comportamiento similar al descrito en otros estudios (Diels y col., 2004; Vachon y col., 2002), con una mayor letalidad cuando se incrementó la temperatura de entrada en la máquina de UHPH, lo que indica un claro efecto de la temperatura en los valores de letalidad para todas las cepas estudiadas. Estas observaciones sugieren que la tecnología de UHPH, en combinación con un incremento en la temperatura de entrada puede ofrecer una prometedora alternativa a la pasteurización de la leche y otros alimentos líquidos. Por otra parte, la aplicación de tratamientos de UHPH a temperaturas bajas (6 °C), sería muy interesante para la industria láctea, desde el momento en que la leche podría ser procesada inmediatamente después de la descarga,

con la misma temperatura de refrigeración que trae de los centros de producción. Sin embargo, 3,0 unidades logarítmicas de reducción podrían no ser suficientes, dependiendo de la calidad microbiológica de la leche, por lo que se requiere mejorar las prestaciones de los equipos de UHPH que permitan en el futuro lograr mayores reducciones. Otra consideración importante es la inactivación de enzimas, tales como las lipasas, para poder determinar la mejor temperatura de entrada para los tratamientos de UHPH de leche, otros productos lácteos y zumos de frutas.

En el presente trabajo, el nivel de inactivación observado en todas las cepas, entre las diferentes matrices estudiadas, fue diferente. La leche desnatada mostró los valores más bajos de letalidad en comparación con la leche entera y el zumo de naranja para las cepas *E. coli* ATCC 10536 y *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, presurizadas a 6 y 20 °C (Figura 9). En leche entera, se observaron los mayores niveles de inactivación, a una temperatura de entrada de 20 °C ( $4,30 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>), para las cepas *L. innocua* (ATCC 33090) y *E. coli* (ATCC 10536), mientras que en zumo de naranja se observaron niveles de reducción intermedios. Vachon y col. (2002) obtuvieron reducciones de aproximadamente 8,0 log UFC/mL en los recuentos de *L. monocytogenes* en PBS, y de aproximadamente 6,0 log UFC/mL en leche, tras un tratamiento de UHPH de 5 pases a 300 MPa. Por otra parte, si se comparan las reducciones para *E. coli* mostradas por Vachon y col. (2002) con las reducciones reportadas por Diels y col. (2005) a la misma presión y temperatura de entrada (300 MPa, 25 °C), se observa una clara diferencia entre leche entera y desnatada a favor de la leche entera, resultados que son similares a los nuestros, aunque ellos usaron en sus estudios temperaturas ligeramente superiores (25 °C).

Esta mayor eficiencia de la alta presión fue observada previamente en leche ovina con diferentes porcentajes de grasa (0, 6 y 50 %) tratada por HHP, donde la leche con 0 % de grasa mostró un efecto baroprotector en todas las condiciones de presurización para los microorganismos estudiados, incluyendo la *E. coli* ATCC 10536 (Gervilla y col., 2000). Estos investigadores sugieren en sus estudios que la causa de este comportamiento podría ser el aumento de la concentración de ciertas

sustancias liposolubles con un efecto antibacteriano, causado a su vez por el aumento en el contenido de materia grasa, que causaría intercambios entre los triglicéridos de la leche con lipoproteínas de la membrana celular, lo que alteraría la permeabilidad de los microorganismos.

### 2.1.3. Daños subletales inducidos en cepas bacterianas tratadas UHPH

Cuando comparamos los valores de letalidad para todas las cepas evaluadas entre los medios TSAYE y TSAYE + NaCl dentro de la misma matriz y a la misma temperatura de entrada, no se observó ninguna diferencia significativa, indicando que los tratamientos de UHPH (300 + 30 MPa) causaron pocos, o ningún daño subletal en *L. innocua*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. carnosus* y *S. aureus*. Resultados similares han sido descritos por Wuytack y col. (2002), los cuales no observaron daños subletales en cepas de *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus* inoculados en PBS y presurizados entre 100 y 300 MPa. Los investigadores reportan que ninguno de los medios selectivos empleados, entre los cuales se encontraba el NaCl (0-6 %), el dodecil sulfato de sodio (SDS 0-100 mg/litro) y un buffer (pH 5,5-7,0), causó un incremento en el nivel de reducción de estos 2 microorganismos con respecto al mismo medio sin el factor selectivo, confirmando que los tratamientos de UHPH entre 100 y 300 MPa no causan daños subletales en *Y. enterocolitica* y *S. aureus*.

Por otra parte, este mismo grupo de investigación describen en otro estudio (Wuytack y col., 2003) que los tratamientos de UHPH causaron pocos, o ningún, daño subletal en *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* cuando fue inoculada en PBS y presurizada entre 100 y 200 MPa, con una temperatura de entrada de 25 °C. Adicionalmente, en este mismo estudio, los investigadores observaron que el número de lesionados era menor al generado por otras tecnologías entre las que se incluye la HHP, los tratamientos térmicos y otras tecnologías emergentes. La HHP se ha descrito que puede causar la acumulación de daños subletales, conllevando una recuperación subsiguiente de las células, dependiendo de las condiciones del tratamiento y

almacenamiento posterior (De Iamó-Castellví y col., 2005a). Si las células que sobreviven a los tratamientos de UHPH no están dañadas, se puede suponer que ellas no serán más sensibles a otros tratamientos, o a condiciones de crecimiento desfavorables, tales como bajo pH o baja temperatura. En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en los recuentos viables en ningún momento del almacenamiento entre TSAYE y TSAYE + NaCl en las muestras tratadas a la misma temperatura de entrada.

#### **2.1.4 Evolución de los recuentos de cepas bacterianas tratadas por UHPH y almacenadas a 4 °C**

La evolución de los recuentos de *L. innocua* ATCC 33090, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, *S. carnosus* CECT 4491 y *S. aureus* ATCC 13565 en muestras de leche y zumo de naranja presurizadas a 300 + 30 MPa, y almacenadas a 4 °C, se muestran en los capítulos V, VI, VII, y VIII del presente trabajo. La evolución de los recuentos de microorganismos viables en ambos medios (TSAYE y TSAYE + NaCl), para muestras presurizadas a ambas temperaturas de entrada (6 y 20 °C), fueron similares para cada una de las cepas probadas. La comparación de la evolución de los recuentos de *L. innocua* (capítulo V), *E. coli*, *E. coli* O157:H7 (capítulos VI y VII), *S. carnosus* y *S. aureus* (capítulo VIII) entre TSAYE y TSAYE + NaCl, durante los días del almacenamiento en muestras de leche y zumo de naranja presurizadas a la misma temperatura de entrada, no mostraron diferencias significativas en ningún día, confirmando que los tratamientos de UHPH a 300 + 30 MPa no causaron daños subletales aparentes en ninguna de las cepas estudiadas, cuando fueron empleados medios de cultivo estresantes para detectar estas lesiones.

La temperatura de almacenamiento no ejerció ningún efecto significativo en la evolución de los recuentos viables de *L. innocua* en la leche en refrigeración (capítulo V), mostrando el mismo comportamiento en muestras de leche control y presurizadas, almacenadas a 4 °C, lo que confirma su capacidad de sobrevivir y crecer en

refrigeración, incluso después de los tratamientos de UHPH. Los resultados de este trabajo indican que la leche no interfirió o estimuló en el crecimiento de los microorganismos durante la refrigeración. Las características de la leche, con un pH cercano a la neutralidad (6,7) y la una gran presencia de nutrientes, podrían haber favorecido la evolución de los recuentos sólo en *L. innocua* a bajas temperaturas.

Las cepas de *E. coli* mostraron un comportamiento diferente en leche, al presentar una tendencia decreciente de aproximadamente 0,3 unidades logarítmicas a lo largo del almacenamiento en refrigeración. Al igual que para *L. innocua*, no se observaron diferencias en la evolución de los recuentos entre las muestras presurizadas y los controles, por lo que la temperatura de almacenamiento no ejerció ningún efecto significativo en el comportamiento de los recuentos viables de las cepas de *E. coli* en la leche presurizada a una misma temperatura de entrada. *S. carnosus* y *S. aureus*, inoculados en leche, mostraron un comportamiento similar a las cepas de *E. coli*, al presentar también una ligera tendencia decreciente, de aproximadamente 0,2 unidades logarítmicas, a lo largo del almacenamiento. Tampoco mostraron estas cepas diferencias significativas en la evolución de los recuentos de muestras presurizadas y controles.

El comportamiento en el tiempo de los recuentos de microorganismos viables en zumo de naranja para las muestras presurizadas a ambas temperaturas de entrada (6 y 20 °C) y almacenadas a 4°C, fue completamente diferente en comparación con el mostrado en la leche, para todas las cepas estudiadas (capítulos V, VII, VIII). Los recuentos en el zumo de naranja usando TSAYE y TSAYE + NaCl mostraron una clara tendencia decreciente, de aproximadamente 2,0, 3,0 y 4,0 unidades logarítmicas, para las cepas de *Listeria*, *Escherichia* y *Staphylococcus*, respectivamente, a lo largo del almacenamiento a 4 °C. Para todas las cepas evaluadas, las muestras de zumo de naranja inoculadas sin tratar (controles) mostraron el mismo comportamiento que las muestras presurizadas y almacenadas a bajas temperaturas, lo que confirma que la temperatura de almacenamiento no ejerció ningún efecto significativo en el

comportamiento de los recuentos viables de las cepas de *Listeria*, *Escherichia* y *Staphylococcus* después de los tratamientos de UHPH.

La cepa de *L. innocua*, conjuntamente con las cepas de *E. coli*, resultaron ser más resistentes a las condiciones de bajo pH del zumo de naranja a lo largo de los 21 y 33 días de almacenamiento a 4 °C, respectivamente. Por su parte, las cepas de *Staphylococcus* resultaron ser muy sensibles a estas condiciones de acidez y almacenamiento, mostrando una evolución decreciente hasta el día 15 de almacenamiento a 4 °C. El bajo pH del zumo de naranja (3,6) podría haber causado interferencias en la evolución de los recuentos viables de todas las cepas a bajas temperaturas, y en el caso de los *Staphylococcus* causo que este disminuyera sus recuentos a niveles muy bajos hacia el día 12 de almacenamiento. Cuando se comparan los recuentos entre los medios TSAYE y TASAYE + NaCl en las muestras presurizadas para todas las cepas evaluadas y en cada uno de los días del almacenamiento, no se observó ninguna diferencia significativa en ningún día, confirmando que esta matriz, al igual que ocurre con la leche, el tratamiento por UHPH a 300 + 30 MPa no causa ningún daño subletal aparente en las cepas de *Listeria*, *Escherichia* y *Staphylococcus*.

No se han encontrado estudios previos acerca de la evolución de los recuentos de microorganismos viables de las cepas estudiadas en este trabajo, inoculadas en leche y zumo de naranja tras un tratamiento por UHPH. Sin embargo, en un estudio conducido por Vannini y col. (2004), se describe un incremento de los recuentos de microorganismos viables de aproximadamente 3,0 y 3,5 unidades logarítmicas en leche desnatada, aunque después de haber sido presurizada solo a 130 MPa e incubada a 37 °C, por 33 horas y 3 días para *E. coli* y *L. monocytogenes*, respectivamente. En un estudio anterior con leche tratada por HHP, De Lamo-Castellví y col. (2005b) reportaron que varias cepas de *Yersinia enterocolitica* fueron capaces de incrementar sus recuentos (8,0 unidades logarítmicas) en leche desnatada tras 15 días de almacenamiento a 8 °C. Estas muestras habían sido sometidas a un tratamiento HHP de 500 MPa y, aparentemente el tratamiento habría causado una completa inactivación

del microorganismo. En general, en este trabajo los tratamientos de UHPH fueron más eficientes cuando se aplicaron en leche que en zumo de naranja en las mismas condiciones. Este hecho contrasta con algunas observaciones hechas para diferentes alimentos tratados por HHP, donde las bacterias mostraron mayor sensibilidad a los tratamientos cuando se encontraban en condiciones de bajo pH (Ritz y col., 2000).

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., Lundén, J., Korkeala, H., y Sjöberg, A. M. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20(3), 237-250.
- Anónimo. (1990). Council Directive 90/679/EEC of 26 November 1990 on the protection of workers from risk related to exposure to biological agents work (seventh individual directive within the meaning of article 16 (1) of directive 89/391/EEC). *Official Journal of European Union*, L 374, 5, 0001-0012.
- Anónimo. (1998). Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - test method and requirement (phase 2 step 1). UNE-EN-1276., 1-35.
- Bruins, G., y Dyer, J.A. (1995). Environmental considerations of disinfectants used in agriculture. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14 (1), 82-94.
- De Iamó-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., y Roig-Sagués, A. X. (2005a). Behaviour of *Yersinia*

- enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 68(3), 528-523.
- De Iamó-Castellví, S., Capellas, M., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., y Roig-Sagués, A. X., (2005b). Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 337-342.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michels, C. W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3) 281-291.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michels, C. W. (2004). Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1512-1517.
- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., y Michels, C. W. (2003). Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1), 55-62.
- Herruzo, R. (2000). Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, Tomo CXVII, 791-806.
- Holah, J. T. (1995a). Disinfection of food production areas. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Épizooties*, 14(2), 343-363.



- Holah, J. T. (1995b). Progress report on CEN/TC 216/Working group 3: Disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36(3-4), 355-365.
- Fatemi, P., y Frank, J. F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*, 62(7), 761-765.
- Frank, J. F., y Chmielewski, R. A. N. (1997). Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *Journal of Food Protection*, 60(1), 43-47.
- Frank, J. F., y Koffi, R. A. (1990). Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*. 53(5), 550-554.
- Gervilla, R., Ferragut, V., y Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 674-682.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., y Fliss, I. (2002). Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12(5), 435-446.
- Lee, S. H., y Frank J. F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection*, 54(1), 4-7.

- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., y Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 265-272.
- Mosteller, T. M., y Bishop, J. R. (1993). Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection*, 56(1), 34-41.
- Mullerat J, Sheldon B. W., y Arlene-Klapes N. (1995). Inactivation of *Salmonella* Species and Other Food-Borne Pathogens with Salmide®, a Sodium Chlorite-Based Oxyhalogen Disinfectant. *Journal of Food Protection*, 58(5), 535-540.
- Park, H., Hung, Y-C., y Chung, D. (2004). Effects of chloride and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 13-18.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M, y Federighi, M. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiology*. 17(4), 375-382
- Ronner, A. B., y Wong, A. C. L. (1993). Biofilms development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, 56(6), 750-758.
- Taormina, P.J., y Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 71-80.

- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., y Fliss, I. (2002). Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65(2), 345-352.
- Van de Weyer, A., Devleeschouwer M. J., y Dony J. (1993). Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(4), 480-483.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Balde, D., y Guerzoni M. E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 123-136.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., y Michels, C. W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3) 205-212.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. M. J., y Michels, C. W. (2003). Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66(1), 31-37.
- Yu, K., Newman, M. C., Archbold, D. D., y Hamilton – Kemp, T. R. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry fruit and reduction of population by chemical agents. *Journal of Food Protection*, 64(9), 1334-1340

**CAPÍTULO**

**DÉCIMO**

---

**CONCLUSIONES**

## 1. CONCLUSIONES

Se ha realizado un estudio de la inactivación por UHPH de *L. innocua*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* y *S. carnosus*, inoculados leche y zumo de naranja presurizadas a 300 + 30 MPa, con un único pase y temperaturas de entrada de 6 y 20 °C. Además, se evaluó la eficacia bactericida de una mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno contra cepas de estos mismos microorganismos, para desarrollar un procedimiento de limpieza y desinfección eficiente, aplicable a la máquina de UHPH. En las condiciones establecidas en este trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- La mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno ensayada es efectiva, en pruebas de suspensión, contra todos los microorganismos estudiados a concentraciones iguales o superiores a 0,1 % y tiempos de exposición superiores a 10 minutos, incluso en presencia de materia orgánica.
- 2.- Las cepas de *Staphylococcus carnosus* y *Staphylococcus aureus* presentan una mayor resistencia a la mezcla de ácido peracético y peróxido de hidrógeno que *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* Scott A.
- 3.- Las cepas bacterianas patógenas y no patógenas estudiadas muestran la misma sensibilidad al producto desinfectante, por lo que las cepas *S. carnosus* CECT 4491, *E. coli* ATCC 10536 y *L. innocua* ATCC 33090 pueden ser utilizadas para remplazar a las cepas patógenas de sus mismos géneros en la valoración de la eficacia de los productos desinfectantes, disminuyendo el riesgo de exposición a estos agentes.
- 4.- Las mismas concentraciones del desinfectante que son efectivas contra cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Listeria* en pruebas de suspensión, no son

efectivas cuando se aplican en las superficies de un equipo de UHPH, tras ser usado para presurizar muestras de leche y zumo de naranja inoculadas con los mismos microorganismos, siendo necesario mayores concentraciones.

5.- Los tratamientos por UHPH de leche entera, desnatada y zumo de naranja a 300 + 30 MPa, con un único pase y temperaturas de entrada de 6 y 20 °C, permiten alcanzar reducciones superiores a las 3,0 unidades logarítmicas a todos los microorganismos estudiados, a excepción de *S. carnosus*.

6.- El grado de sensibilidad a la UHPH observada en los diferentes microorganismos estudiados, en las condiciones de tratamiento evaluadas, presento el siguiente orden: *Escherichia coli* = *Listeria innocua* > *Escherichia coli* O157:H7 > *Staphylococcus aureus* > *Staphylococcus carnosus*.

7.- Los valores de letalidad se incrementan con la temperatura de entrada, siendo mayores a 20 °C que a 6 °C, para todos los microorganismos y matrices estudiadas.

8.- El grado de letalidad alcanzado para los diferentes microorganismos, tras la aplicación del tratamiento de ultra alta presión de homogeneización, es diferente en función del tipo de matriz donde son inoculados. Las letalidades son menores en zumo de naranja que en leche, mientras que para las cepas de *Escherichia coli* las letalidades son significativamente mayores cuando se tratan en leche entera que en leche desnatada.

9.- El tratamiento de UHPH a 300 + 30 MPa, con un único pase y a temperaturas de entrada de 6 y 20 °C, no causa daños subletales aparentes a ninguno de los microorganismos estudiados, cuando son tratados en leche entera, leche desnatada y zumo de naranja.

10.- Los recuentos de los microorganismos estudiados, inoculados en las muestras de leche presurizadas y control se reducen a lo largo del tiempo de almacenamiento a 4 °C, a excepción de *L. innocua* que incrementa sus recuentos.

11. Las cepas de *E. coli* muestran una gran resistencia pos-tratamiento a las condiciones de almacenamiento en refrigeración en zumo de naranja, manteniendo recuentos viables altos hasta el día 21 de almacenamiento a 4 °C.

12.- No se detectaron daños subletales aparentas en ninguna de las cepas evaluadas con los métodos de cultivo utilizados tras el tratamiento de UHPH. La evolución de los recuentos de los microorganismos inoculados durante el periodo de conservación a 4 °C, fue similar en las muestras tratadas por UHPH respecto a las muestras control no tratadas, lo que indica que el tratamiento no causa cambios en los microorganismos supervivientes que implique una mayor sensibilidad a las condiciones ambientales adversas.

13.- La tecnología de la ultra alta presión de homogeneización, en combinación con un aumento de la temperatura de entrada de las muestras y de la presión de tratamiento, podría incrementar sensiblemente la letalidad de las cepas estudiadas, siendo necesario para su confirmación más estudios.

## **ANEXOS**

---

### **COMUNICACIONES A CONGRESOS**



## EFICACIA BACTERICIDA DEL ÁCIDO PERACETICO CONTRA CEPAS PATÓGENAS Y NO PATÓGENAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y *LISTERIA* SPP. EN PRESENCIA DE MATERIA ORGÁNICA

**Autores:** Wilfido José Briñez, Artur X. Roig Sagués, M<sup>a</sup> Manuela Hernández, Buenaventura Guamis

El objetivo de esta investigación fue evaluar la eficacia bactericida del ácido peracético (oxonia activo) contra cepas de *Listeria* y *Escherichia coli* en diferentes tipos de materia orgánica, tiempos de exposición y concentración de desinfectante, así como, comparar la resistencia de cepas patógenas y no patógenas de estos géneros en busca de microorganismos alternativos para usar en la valoración de desinfectantes de la normativa Europea. Los experimentos para determinar la actividad bactericida del desinfectante fueron desarrollados de acuerdo a la prescripción del método de ensayo de suspensión de la norma Europea UNE-EN-1276. Fueron usadas 4 cepas *E. coli* CECT 405, *E. coli* O157:H7 CECT 5947, *L. innocua* CECT 910T y *L. monocytogenes* Scott A. El PPA fue probado a 5 concentraciones (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 % v/v) en tres tiempos de exposición (10, 20, 30 minutos) usando leche semidescremada, zumo de naranja, huevo líquido y batido de chocolate estériles en soluciones al 1 % (v/v) como sustancias interferentes. Los datos fueron analizados a través del paquete estadístico SAS, utilizando un análisis de varianza y probando las medias por el método de los mínimos cuadrados. Se obtuvieron medias de reducción log<sub>10</sub> UFC/ml para *E. coli* CECT 405 6,17, *E. coli* O157:H7 6,22, *L. innocua* 6,21 y *L. monocytogenes* 6,20. Se observaron diferencias significativas (P≤0,05) de la eficacia bactericida entre géneros, tipos de materia orgánica, tiempos de exposición y concentración de ácido peracético. No se encontró diferencias en la eficacia bactericida entre cepas patógenas y no patógenas dentro del mismo género. Se concluye que se pueden sustituir cepas patógenas por no patógenas dentro del mismo género en valoraciones de desinfectantes donde no sea posible su utilización por tener las no patógenas valores de reducción semejantes