

INDUSTRIE ALIMENTARI

CAREMOLI
Qualità e Tradizione

**Ingredienti e semilavorati
per l'industria alimentare**

Made by Nature

IRS
J. RETTENMAIER & SÖHNE
MANUFACTURERS OF FIBRES

CNI COLLOIDES
NATURELS
INTERNATIONAL

LABORATOIRES FRANÇOIS
INNOVATIONS DRAGÉIFIÉES
POUR L'INDUSTRIE®

BARTEK

KORTUS
FOOD INGREDIENTS SERVICES

Smet

RIBUS, Inc.
Makers of Specialty Ingredients

CAROCHOC®

TAURA URC®
NATURAL INGREDIENTS

TRANSFORMADORA AGRICOLA

LBG®
SICILIA
natural gums

Exquim, s. a.

JANCKE

**STARLIGHT
PRODUCTS**

SCANSMOKE®

RUBINMÜHLEN
RUND UM'S KORN

VitaSweet®

SWISS GUM



DECAS CRANBERRY PRODUCTS, INC.

CAREMOLI Srl - Viale delle Industrie, 17 - 20090 Settala (Mi) - Tel. (+39) 02.95.37.52.21 - Fax (+39) 02.95.37.51.97 - info@caremoli.it



SUMMARY

The features of a sanitization process for foods based on Pulsed Electric Fields technology (PEF) is described and discussed. A laboratory experimental apparatus operated under electric fields up to 40 kV/cm and with different pulse length and frequency has been set into operation. Experiments on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* have been carried out in different conditions. Results demonstrate that the most critical condition is the realization of a uniform electric field in the treatment chamber. However, a good mixing of the sample can help in enhancing the effectiveness of the process. In these conditions, a reduction up to 6 decades of microorganism viability can be obtained. Preliminary tests on liquid foods demonstrate that PEF processes can be envisaged for industrial applications of food stabilisation.

SOMMARIO

È presentata e discussa la tecnica di sanitizzazione di prodotti alimentari mediante l'impiego di campi elettrici pulsati (PEF). È stata realizzata un'apparecchiatura sperimentale in grado di operare con campi elettrici fino a 40 kV/cm, con un treno di impulsi variabile per numero, ampiezza e frequenza. Sono stati condotti esperimenti di abbattimento della carica microbica su soluzioni modello contenenti colonie di *Saccharomyces cerevisiae*. Dalla sperimentazione è emerso che la maggiore criticità della tecnica sta nell'ottenere la perfetta uniformità del campo elettrico. In alternativa è possibile miscelare il campione durante le prove allo scopo di ottenere un trattamento efficace sull'intero volume. In queste condizioni si può ottenere un livello di disattivazione dei microrganismi fino a 6 decadi. Prove preliminari su alimenti liquidi hanno confermato i risultati, che appaiono promettenti rispetto all'utilizzazione industriale della tecnologia PEF.

GIORGIO DONSI - GIOVANNA FERRARI - GIANPIERO PATARO

Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare e Centro Regionale di Competenza sulle Produzioni Agroalimentari - Università di Salerno - Via Ponte don Melillo - 84084 Fisciano - Sa - Italia

Campi elettrici pulsati per la stabilizzazione microbiologica di alimenti

Pulsed electric fields for food microbiological stabilization

INTRODUZIONE

L'utilizzazione di tecnologie cosiddette miti nel trattamento di stabilizzazione di prodotti alimentari desta un interesse sempre maggiore, sulla scorta della propensione crescente del consumatore verso prodotti alimentari con le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del fresco. In particolare si tende a sostituire i trattamenti termici tradizionali di sterilizzazione o pastorizzazione con trattamenti più blandi dal punto di vista dell'impatto termico, allo scopo di preservare i componenti termolabili dell'alimento, che spesso lo caratterizzano per quanto riguarda il profilo aromatico e nutrizionale.

Tra le tecnologie innovative proposte negli ultimi anni per la stabilizzazione microbiologica non termica di sostanze alimentari, merita un'attenzione particolare il trattamento con campi elettrici pulsati (PEF), oggetto di studi sperimentali e teorici nell'ultimo decennio (Jayaram *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994; Qin *et al.*, 1995; Barbosa-Canovas

et al., 1999; Manas *et al.*, 2001; Cserhalmi *et al.*, 2002). Il processo PEF presenta potenzialmente numerosi vantaggi, in quanto consente, attraverso un'opportuna scelta delle condizioni operative, di produrre modesti innalzamenti di temperatura e di inattivare cellule vegetative di batteri, lieviti e muffe, sospese in mezzi liquidi omogenei anche a temperatura ambiente. Il meccanismo di inertizzazione dei microrganismi sembra infatti legato ad un processo fisico di elettroporazione della membrana cellulare a causa dell'azione elettro-compressiva di cariche elettriche di segno opposto indotte da un campo elettrico esterno sui due lati della membrana cellulare elettricamente isolante (Zimmermann *et al.*, 1975).

La tecnica è adatta per processare liquidi alimentari omogenei di bassa conducibilità oltre che matrici solide omogenee. Nonostante le promettenti caratteristiche, l'applicazione di tecniche PEF a linee di produzione industriali non è ancora diffusa per due motivi:
- la tecnologia delle apparecchiature

non è ancora pienamente affidabile e matura;

- le prestazioni del processo di stabilizzazione non sono ancora prevedibili con precisione per i diversi tipi di alimento e di condizioni operative.

Entrambi i motivi dipendono dalla scarsa conoscenza della fisica dei fenomeni coinvolti e dalla conseguente mancanza di modelli predittivi in grado di descriverli. Da ciò nasce la necessità di procedere ad ampie campagne sperimentali volte ad individuare i meccanismi di

interazione campo elettrico-microrganismi come base per la modellazione quantitativa dei fenomeni coinvolti e la predizione delle relazioni tra variabili operative e prestazioni delle apparecchiature di trattamento.

Il presente lavoro descrive un approccio sperimentale volto a definire quantitativamente le cinetiche di inattivazione di un particolare microrganismo, il *Saccharomyces cerevisiae*, sotto l'effetto di campi elettrici di diversa intensità applicati attraverso impulsi di diversa durata

e frequenza. Tende inoltre a valutare gli aspetti maggiormente critici della tecnica proposta al fine di ricavare indicazioni sulle più efficaci modalità di applicazione dei PEF.

MATERIALI E METODI

Microrganismo e terreni di coltura

Il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* adottato nel corso delle prove sperimentali è stato selezionato a partire da un panetto di lievito di birra (Levital). Una coltura di *S. cerevisiae* è stata ottenuta, a partire da una precoltura, inoculando 0,1 mL di sospensione cellulare in 200 mL di brodo MRS (OXOID) sterile ed incubata poi a 32°C. Campioni prelevati dopo un tempo di incubazione di 16 e 40 h contenevano cellule di lievito in fase di crescita esponenziale e stazionaria, rispettivamente.

Mezzi di trattamento

I trattamenti PEF sono stati condotti sospendendo le cellule di *S. cerevisiae* tanto in soluzioni modello quanto in matrici alimentari. Le caratteristiche dei campioni per quanto riguarda attività dell'acqua, concentrazione Brix, pH e conducibilità elettrica sono riportate in **tab. 1**.

Apparecchiatura sperimentale

I trattamenti mediante campi elettrici pulsati sono stati condotti con un'apparecchiatura su scala di laboratorio operante in condizioni batch, interamente progettata e realizzata presso il Laboratorio di Operazioni Unitarie del Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare dell'Università degli Studi di Salerno (**fig. 1**).

Il sistema realizzato è in grado di generare impulsi in campo elettrico sotto forma di

Tabella 1 - Mezzi di trattamento e loro proprietà fisiche.

Mezzo di trattamento	a_w	°Brix [%]	pH	k [mS/cm]
Trizma-HCl buffer	~1	0,6	7,2	2
Succo di mela annurca	0,977	15,7	3,65	1,74
Succo d'arancia commerciale	0,990	12,1	3,85	3,85

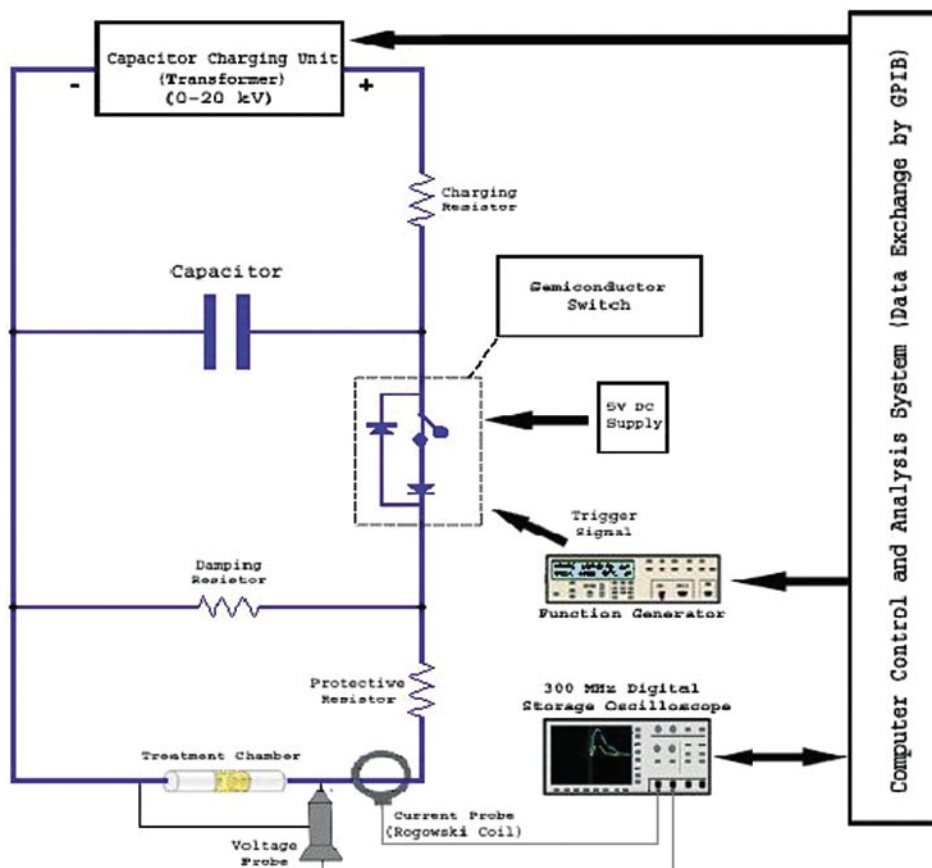


Fig. 1 - Schema semplificato dell'apparecchiatura PEF realizzata presso il Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare dell'Università di Salerno.

onde a decadimento esponenziale, prodotte dalla scarica di un banco di condensatori (C-20-C683, Vishay, USA) di capacità totale pari a 136 nF. Per la carica dei condensatori si usa un generatore di alta tensione in corrente continua (FUG, HCK 800M-20000, Rosenheim) capace di erogare una tensione ed una corrente fino a 20 kV e 80 mA, rispettivamente. Uno switch di tipo OFF, basato sulla tecnologia SCR (HTS 240-800-SCR, Behlke Electronics) e in grado di commutare fino a 24 kV e 8 kA con un tempo di commutazione di 400 ns, consente la scarica dell'energia temporaneamente immagazzinata nel banco di condensatori attraverso l'alimento posto nella camera di trattamento. Un generatore di funzione (AFG 320, Wilsonville, OR, USA) è utilizzato per indirizzare allo switch un opportuno segnale di triggering. La camera di trattamento è costituita da due elettrodi cilindrici in acciaio inossidabile distanziati da uno spaziatore in materiale isolante che determinano la cavità cilindrica entro cui è inserito l'alimento da processare. L'area degli elettrodi in contatto con l'alimento è di 2 cm², mentre la distanza tra gli elettrodi è di 0,25 cm.

Un piccolo foro praticato sulla superficie dello spaziatore isolante permette l'introduzione ed il prelievo del campione dalla regione di trattamento.

Per ottenere impulsi in campo elettrico di diversa ampiezza senza variare la capacità del banco di condensatori e/o le caratteristiche del mezzo di trattamento, è stata utilizzata una resistenza variabile collegata in parallelo alla camera di trattamento.

I segnali di tensione e corrente che interessano la camera di trattamento durante il processo ad impulsi sono misurati tramite opportune sonde ed acquisiti e visualizzati mediante un oscilloscopio digitale (Tektronix, TDS 3034B).

L'intero sistema è gestito da remoto mediante un software elaborato in LabView 6.1 (National Instruments) e utilizzando il protocollo di comunicazione GPIB che consente uno scambio di dati

multidirezionali tra i vari dispositivi di controllo (computer, generatore di funzioni d'onda, oscilloscopio e generatore di tensione).

Il programma LabView per la gestione del sistema è inoltre in grado di calcolare i principali parametri elettrici di interesse sulla base delle forme d'onda di tensione e corrente, alla camera di trattamento acquisite dall'oscilloscopio. Il massimo campo elettrico (E, kV/cm) corrisponde al picco di tensione diviso per la distanza tra gli elettrodi. Il tempo di trattamento è calcolato come il prodotto tra il numero di impulsi applicati e l'ampiezza di ciascun impulso.

L'ampiezza dell'impulso è calcolata come il tempo necessario a diminuire la tensione al 37% del suo valore di picco. L'energia elettrica dissipata nel campione dopo ciascun impulso è calcolata secondo la seguente equazione:

$$W_{\text{pulse}} = \int_0^t u(t) \cdot i(t) dt$$

dove $u(t)$ rappresenta la tensione attraverso gli elettrodi e $i(t)$ la corrente che attraversa la camera di trattamento all'istante t .

Nel corso della sperimentazione i parametri di processo sono stati variati come segue: campo elettrico tra 3 e 30 kV/cm; numero di impulsi tra 1 e 512; ampiezza dell'impulso tra 2 e 9 μ s; frequenza di trattamento tra 1 e 5 Hz.

Esperimenti di inattivazione microbica

Prima del trattamento, le cellule di *S. cerevisiae* sono state separate dal mezzo di crescita per centrifugazione a 5.000 giri per 5 min a 20°C e, subito dopo, risospese in un opportuno volume del mezzo di trattamento fino ad una concentrazione finale compresa tra 10⁶ e 10⁷ cfu/mL. Successivamente un volume di 0,5 mL di questa sospensione è stato sottoposto a trattamento PEF e al controllo microbiologico mediante il metodo della conta su piastra delle unità formanti colonia.

RISULTATI

La sperimentazione preliminare condotta sulla soluzione tampone inoculata con i lieviti ha consentito di appurare che il grado di disattivazione dei microrganismi ottenuto dopo il trattamento PEF ha le seguenti proprietà:

- non dipende dalla concentrazione iniziale di microrganismi nella soluzione;
- non dipende dalla frequenza di trattamento e durata dell'impulso con cui è applicato il campo elettrico;
- dipende poco dal tipo di soluzione tampone utilizzata;
- dipende moderatamente dalla fase di crescita dei microrganismi (esponenziale o stazionaria).

Per tale motivo i risultati riportati in dettaglio riguardano l'applicazione di un trattamento ad impulsi in campo elettrico di determinata ampiezza e frequenza di trattamento ed un solo mezzo di sospensione dei lieviti.

Essi sono riferiti alla fase di crescita stazionaria, che risulta quella di maggior interesse pratico. I parametri sperimentali prescelti sono i seguenti: intensità del campo elettrico e tempo di trattamento (o numero di impulsi).

L'intensità del campo elettrico ed il numero di impulsi applicati sono le variabili chiave del processo di disattivazione dei microrganismi. In **fig. 2** sono riportate le curve di sopravvivenza dei microrganismi in funzione dell'intensità in campo elettrico al variare del numero di impulsi applicati. Come prevedibile, intensità in campo e numero di impulsi crescenti producono un maggiore effetto letale. In **fig. 3** è riportata la dipendenza della curva di sopravvivenza dal tempo cumulativo di trattamento. Si osserva che l'effetto del tempo di trattamento, inizialmente imponente, tende a ridursi, assumendo la curva un andamento all'incirca costante dopo un numero di impulsi corrispondenti ad un tempo di trattamento di circa 150 μ s.

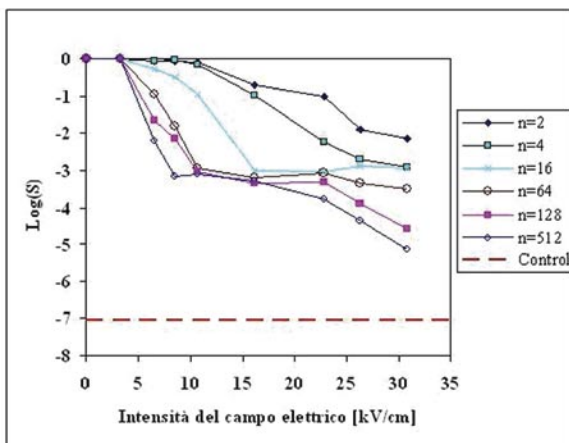


Fig. 2 - Curve di sopravvivenza di *S. Cerevisiae* in funzione del picco in campo elettrico al variare del numero di impulsi. Condizioni di trattamento: Trizma HCl buffer pH 7,2 e $k=2$ mS/cm; frequenza, 1 Hz; ampiezza dell'impulso, 3,11 μ s.

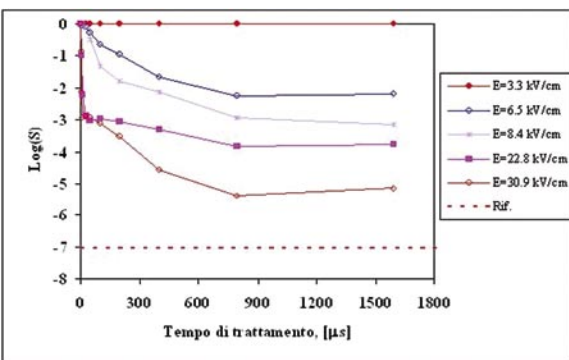


Fig. 3 - Curve di sopravvivenza di *S. cerevisiae* in funzione del tempo di trattamento a differenti valori di picco del campo elettrico. Condizioni di trattamento: Trizma HCl buffer pH 7,2 e $k=2$ mS/cm; frequenza, 1 Hz; ampiezza dell'impulso, 3,11 μ s.

Si può osservare che i valori del grado di disattivazione osservato nelle prove sperimentali di cui alle precedenti figure è sensibile ma di scarso interesse applicativo, in quanto non superiore alle 3-4 decadi. Inoltre, il caratteristico andamento non lineare osservato per le curve di sopravvivenza potrebbe essere indotto da una non uniforme distribuzione di sensibilità al trattamento all'interno della popolazione microbica o da una non uniforme distribuzione del campo elettrico nella regione di trattamento. Per tale motivo si è analizzata la struttura della cella di prova per veri-

care se vi fossero elementi suscettibili di miglioramento. Test effettuati variando la distanza tra gli elettrodi non hanno dato risultati significativi, così come alcuni ritocchi alla forma degli elettrodi, volti ad arrotondare gli spigoli per migliorare l'uniformità di campo.

Si è provveduto quindi ad effettuare una serie di prove su cellule di lievito immobilizzate e in crescita su di un mezzo semi-solido, allo scopo di verificare a posteriori la distribuzione spaziale delle colonie superstiti e, perciò, l'eventuale eterogeneità spaziale del campo elettrico nella camera di trattamento. Questa sperimentazione ha dato risultati positivi, mostrando che la zona della corona circolare corrispondente al bordo degli elettrodi risultava meno soggetta alla letalità dovuta al campo, come appare dalle fotografie riportate in **fig. 4**, in cui si osserva un addensamento delle colonie di lievito lungo il bordo della cella a valle del trattamento. Si è quindi dimostrato che il motivo della bassa efficacia del trattamento risiede nella bassa intensità di campo realizzata al bordo degli elettrodi.

Dal momento che non risultava facile correggere i valori di campo realizzati nella zona periferica della cella, si è optato per una nuova sperimentazione realizzata con un'agitazione manuale ed intermittente del campione liquido nella cella di trattamento durante la prova. Viste le piccole dimensioni della cella, in una prima fase la circolazione è stata ottenuta prelevando, con siringa sterile, il campione durante la prova e reiniettandolo nella cella prima di riprendere il trattamento. Dopo numerosi tentativi, si è scelto di effettuare quest'operazione di miscelazione artificiale ogni 8 impulsi. I risultati ottenuti appaiono decisamente più interessanti in termini di grado di disattivazione ottenuto. La **fig. 5** mostra la curva di sopravvivenza in funzione del tempo cumulativo di trattamento ottenuta praticando la miscelazione del campione secondo quanto descritto. In questo caso, fermo restando l'andamento qualitativo della curva, dovuto presumibilmente ad una distribuzione di

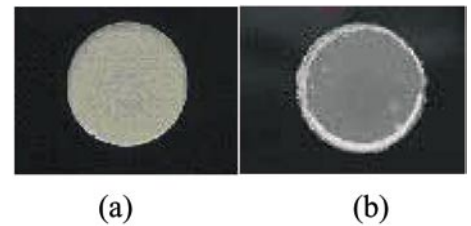


Fig. 4 - Fotografie di dischi di PDA inoculati con *S. cerevisiae*. (a) Riferimento; (b) campione trattato: Campo elettrico 22,6 kV/cm; ampiezza dell'impulso 3,11 μ s; tempo cumulativo di trattamento, 99,5 μ s; frequenza di trattamento, 1 Hz.

sensibilità ai PEF presente all'interno della popolazione del lievito, si realizzano livelli di disattivazione dell'ordine delle 6 decadi, e quindi di interesse pratico nei processi di stabilizzazione.

Rimaneva da valutare l'effetto del processo di trattamento PEF su matrici alimentari reali, per valutare se le conclusioni raggiunte con soluzioni modello potessero essere estese a prodotti alimentari di effettivo interesse.

Le prove preliminari, condotte su succhi di frutta, in particolare mela annurca e arancia, hanno dato i risultati riportati nella **fig. 6**. Si osserva che le curve di sopravvivenza mantengono gli andamenti ritrovati per i microrganismi in crescita nelle soluzioni tampone, e che i livelli di disattivazione raggiunti sono dello stesso ordine di grandezza per tempi complessivi di trattamento dell'ordine dei 100 μ s. Si osserva altresì una differenza tra i due prodotti, risultando la disattivazione nel succo di arancia maggiore di quella ottenuta nel succo di mela. Al momento la possibile spiegazione sta nella diversa conduttività elettrica dei due mezzi: alimenti con maggiore conduttività, come il succo di arancia, richiedono una maggiore energia specifica in ingresso per ottenere un dato campo elettrico e quindi presentano un potenziale di inattivazione dei microrganismi maggiore.

Quale che sia la spiegazione del fenomeno, risulta però evidente che la natura della matrice alimentare costituisce una variabile da investigare con cura prima di procedere alla definizione delle condizioni operative di un processo PEF.

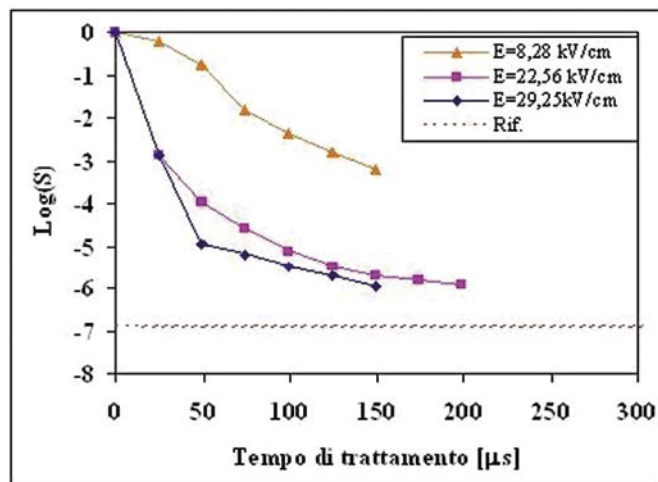


Fig. 5 - Curve di sopravvivenza di *S. cerevisiae* in funzione del tempo di trattamento a differenti valori di picco del campo elettrico e con agitazione manuale del campione ogni 8 impulsi. Condizioni di trattamento: Trizma HCl buffer pH 7,2 and $k=2$ mS/cm; frequenza, 1 Hz; ampiezza dell'impulso, $3,11 \mu\text{s}$.

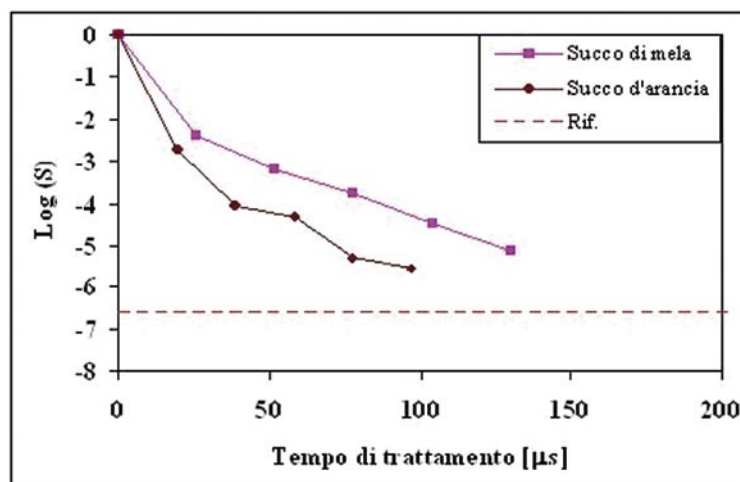


Fig. 6 - Curve di sopravvivenza di *S. cerevisiae* in funzione del tempo di trattamento e con agitazione manuale del campione ogni 8 impulsi. Condizioni di trattamento: $E=22,3$ kV/cm; frequenza, 1 Hz. Succo di mela annurca: pH 3,65 e $k=1,74$ mS/cm; ampiezza dell'impulso, $3,25 \mu\text{s}$; energia specifica per impulso, $2,35$ J/mL. Succo d'arancia pH 3,85 e $k=3,85$ mS/cm; ampiezza dell'impulso, $2,42 \mu\text{s}$; energia specifica per impulso, $3,77$ J/mL.

CONCLUSIONI

Si può affermare, in base ai risultati sperimentali finora prodotti, che la tecnica PEF è potenzialmente applicabile al trattamento di stabilizzazione microbiologica di matrici alimentari liquide. I campi elettrici necessari per ottenere una riduzione commercialmente accettabile della carica microbica sono dell'ordine dei 30 kV/cm.

Mentre non sembra particolarmente rilevante l'effetto della concentrazione microbica iniziale, della frequenza di trattamento o dell'ampiezza dell'impulso, i parametri chiave per l'efficacia del trattamento risultano l'intensità del campo elettrico applicato e il tempo effettivo di trattamento, il cui effetto è fondamentale, anche se gradualmente decrescente al crescere del tempo stesso.

Ancora più critica è l'uniformità di distribuzione del campo elettrico nella camera di trattamento, strettamente legata alla configurazione degli elettrodi. Fortunatamente, tale criticità, difficilmente risolvibile in un'apparec-

chiatura discontinua se non attraverso un'ottimizzazione del disegno degli elettrodi basata su una valutazione numerica della distribuzione del campo elettrico nella cella di trattamento, può essere superata in un'apparecchiatura di processo in flusso attraverso una miscelazione locale particolarmente attiva. In tale caso, con un'accurata scelta della velocità di flusso e della frequenza degli impulsi del trattamento, la mancata uniformità del campo è compensata dalla circolazione degli elementini fluidi che attraversano in successione zone a campo più o meno intenso, sottoponendosi quindi nel tempo agli effetti di inattivazione voluti.

Una soluzione interessante può essere una camera di trattamento con ricircolazione, che potrebbe assicurare contemporaneamente tempi di trattamento lunghi e velocità locali elevate, con una conseguente intensa miscelazione. Circa l'applicazione a specifici prodotti, il caso della pastorizzazione dei succhi di frutta è sicuramente interessante. È richiesto uno studio più ampio sull'effetto delle specifiche caratteristiche della matrice del prodotto, con particolare riferimento alle proprietà dielettriche.

BIBLIOGRAFIA

- G.V. Barbosa-Cánovas, V. Gongora-Nieto, M.M. Pothakamury, B.G. Swanson. "Preservation of foods with pulsed electric fields". Academic Press, London, 1-9, 76-107, 108-155, (1999).
- Z. Cserhalmi, I. Vidacs, J. Beczner, B. Czucor. "Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology". Innovative Food Science & Emerging Technologies, 3, 41-45, (2002).
- S. Jayaram, G.S.P. Castle, A. Margaritis. "Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses". Biotechnol. Bioeng., 40(11), 1412-1420, (1992).
- P. Manas, L. Barsotti, J.C. Cheftel. "Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters and food constituents". Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2, 239-249, (2001).
- B.L. Qin, F.J. Chang, G.V. Barbosa-Cánovas, B.G. Swanson. "Nonthermal inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields". Lebensm. Wiss. Technol., 28(6), 564-568, (1995).
- Q.H. Zhang, A. Monsalve-Gonzalez, G.V. Barbosa-Cánovas, B.G. Swanson. "Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions". Transactions of the A.S.A.E., 37(2), 581-587, (1994).
- U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann. "Dielectric breakdown of cell membranes". Biophysical Journal, 14, 881-899, (1975).