

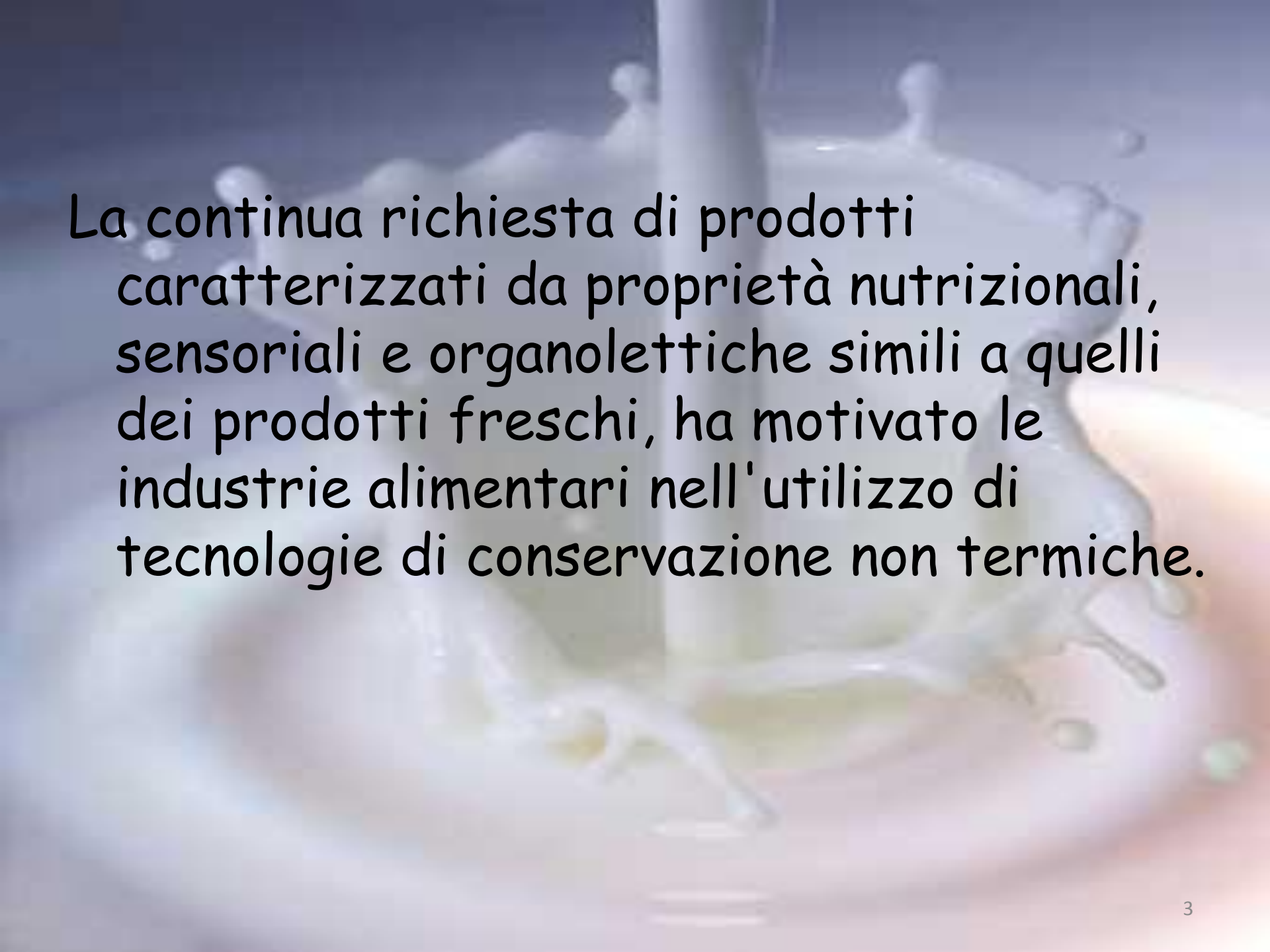
CAMPI ELETTRICI PULSATI

HELP (High Intensity Electric Pulses)

PEF (Pulsed Electric Fields)

Nuove tecnologie non termiche:

- Alte pressioni
- *Campi elettrici pulsati*
- Ultrasuoni
- Ultravioletti
- Luce pulsata
- Ozono
- Plasma freddo
- Irradiazioni
- Anidride carbonica in fase densa



La continua richiesta di prodotti caratterizzati da proprietà nutrizionali, sensoriali e organolettiche simili a quelli dei prodotti freschi, ha motivato le industrie alimentari nell'utilizzo di tecnologie di conservazione non termiche.

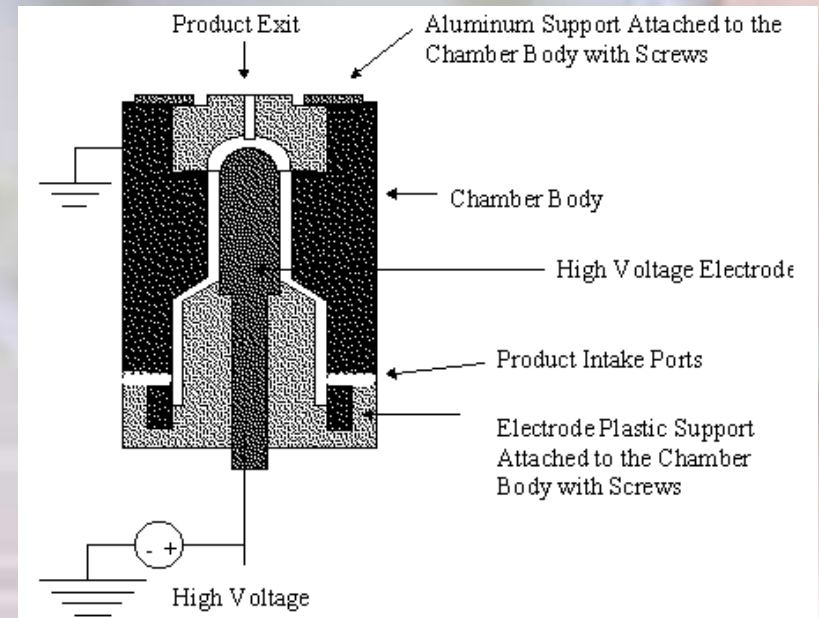
VANTAGGI DELLE TECNOLOGIE DI CONSERVAZIONE ALTERNATIVE DEGLI ALIMENTI

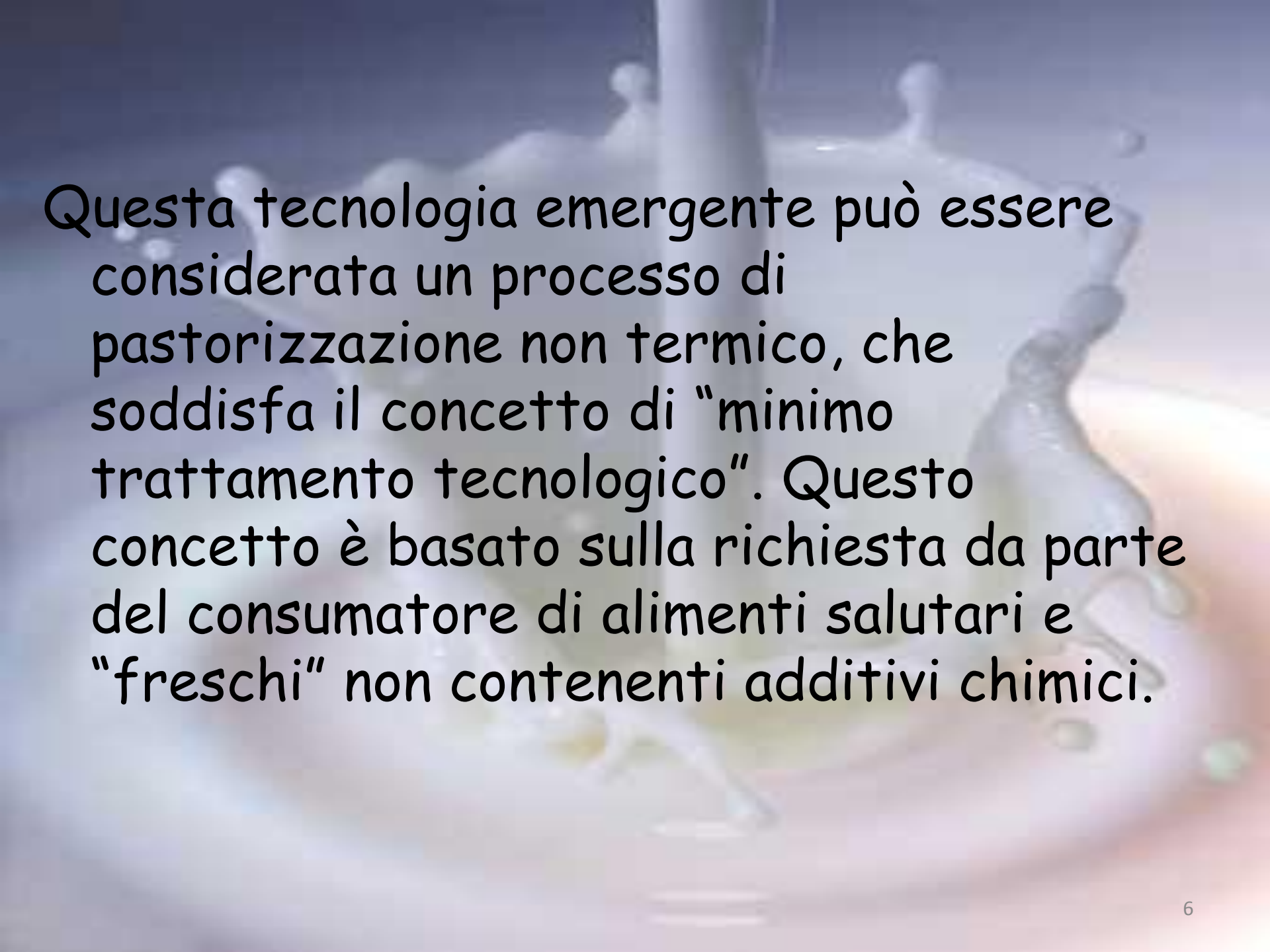
- VERSO I CLIENTI:** miglioramento degli standard di preservazione delle proprietà nutrizionali e sensoriali del prodotto
- VERSO LE IMPRESE:** limitati consumi energetici che migliorano l'efficienza produttiva e quindi la competitività
- VERSO L'AMBIENTE:** minor impatto ambientale sia per il consumo degli input energetici che per gli output di processo

Campi elettrici pulsati

Questa tecnica consiste nell'applicazione dei campi elettrici pulsati, ottenuti da una sorgente di pulsazioni ad alto voltaggio.

Si tratta prevalentemente di una tecnologia di risanamento a freddo di prodotti ad alto contenuto proteico .





Questa tecnologia emergente può essere considerata un processo di pastorizzazione non termico, che soddisfa il concetto di "minimo trattamento tecnologico". Questo concetto è basato sulla richiesta da parte del consumatore di alimenti salutari e "freschi" non contenenti additivi chimici.



Campi d'applicazione

L'applicazione è volta al risanamento di liquidi alimentari omogenei quali succhi di frutta e latte (intero o scremato) birra ovoprodotti e yogurt.

PEF può trovare applicazione anche nell'estrazione di zucchero da barbabietole da zucchero o di olio da piante oleaginose .



In anni più recenti, però, si è visto che tale tecnica può essere utile ed utilizzabile anche per la produzione di alimenti funzionali in quanto determina un aumento della biodisponibilità di componenti minerali se applicata su matrici ricche in fibra (questa tecnica comunque è ancora oggi oggetto di studi e verifiche).





Spettro d'azione



- Lieviti e muffe → molto sensibili
- batteri Gram negativi → molto sensibili
- Le spore → resistenti

Da recenti ricerche si sta valutando l'efficacia di inattivazione delle spore combinando il trattamento dei campi elettrici con metodi basati sul calore

Meccanismo d'azione:

La distruzione dei microrganismi all'interno dell'alimento posto tra una serie di elettrodi è realizzata con applicazione di brevi impulsi ad alto voltaggio, in modo da provocare la rottura delle membrane delle cellule microbiche (elettroporazione), con modesti innalzamenti termici.

Dopo il trattamento, i prodotti sono confezionati in modo asettico e refrigerati.



Il meccanismo molecolare del danno da PEF non sia stato completamente chiarito.

Quando il potenziale trans-membrana eccede un valore critico, si verifica:

- un rapido collasso elettrico della membrana cellulare;
- cambiamenti locali della conformazione della membrana;
- aumento della permeabilità;
- perdita di componenti cellulari.

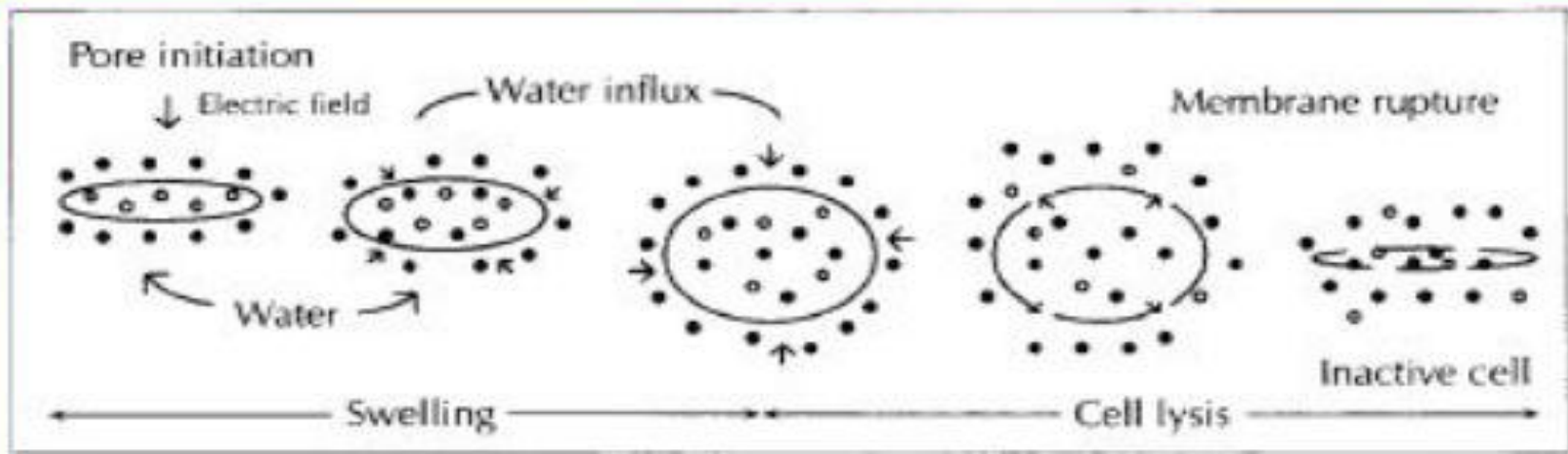


Fig. 1

Mechanism of cell inactivation¹⁶.

Quando si supera il potenziale critico si formano cariche con segno opposto sui due lati della membrana, con compressione della membrana e formazione di pori.

La dimensione dei pori dipende dal campo elettrico e dal numero di impulsi. Quando l'area totale dei pori supera una certa percentuale della superficie della membrana cellulare, quest'ultima si rompe irreversibilmente, altrimenti i pori possono chiudere e la cellula, seppure danneggiata, può sopravvivere al trattamento.

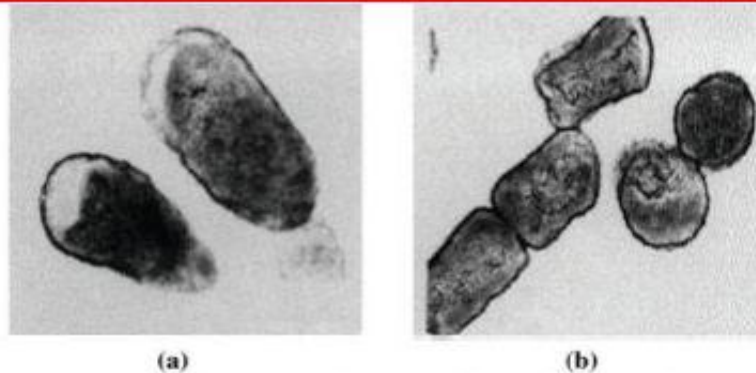


Fig. 1. Pulsed electric fields treated cells of *Escherichia coli* observed with TEM. The bacteria were suspended in phosphate buffer (50 mM, $\sigma = 4.8$ mS/cm, pH 6.8). The field strength applied was 41 kV/cm. (a) Ruptured cells with leakage of the cytoplasmic contents. (b) Internally damaged cells.

RELAZIONE CELLULA-CAMPO



Cellule:

- Dimensioni
- Forma
- Orientamento

Cellule piccole sono più resistenti di cellule grandi → gli eucarioti più sensibili dei procarioti.

Le cellule di forma bastoncellare sono più sensibili se l'asse minore è perpendicolare alla direzione del campo.



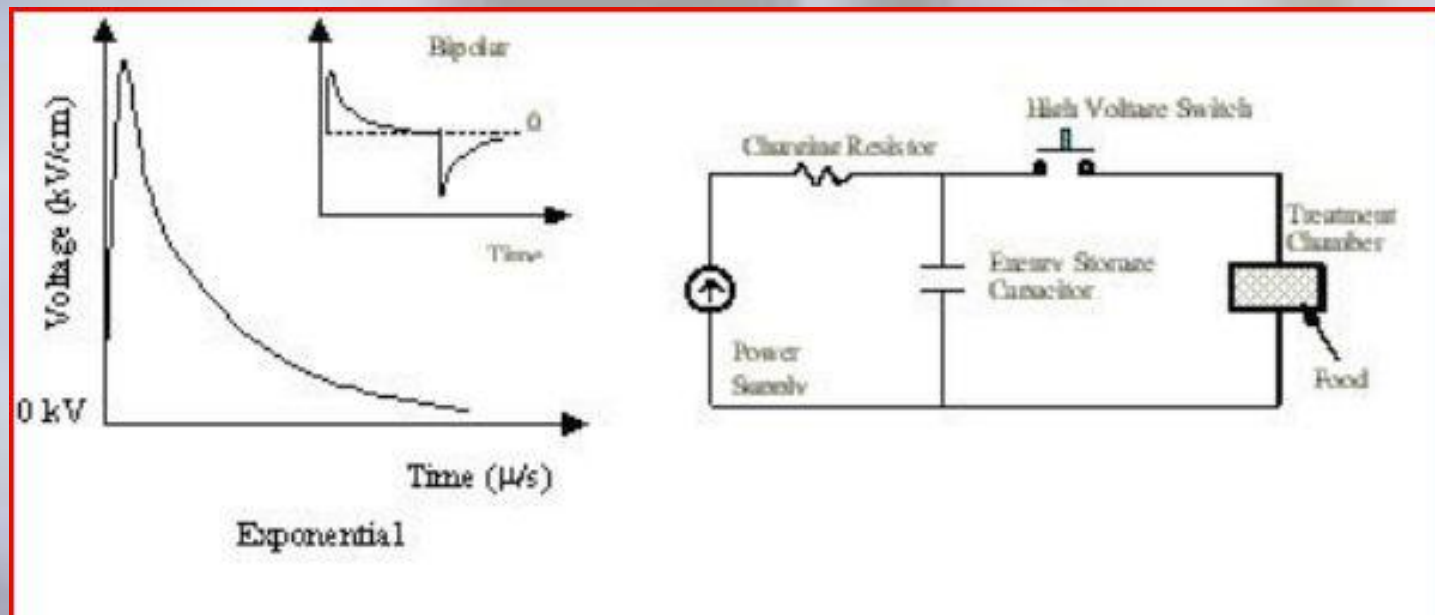
La dimensione cellulare non è il solo
fattore critico anche cellule con la
stessa dimensione possono presentare
differenze di resistenza.

A parità di dimensione..

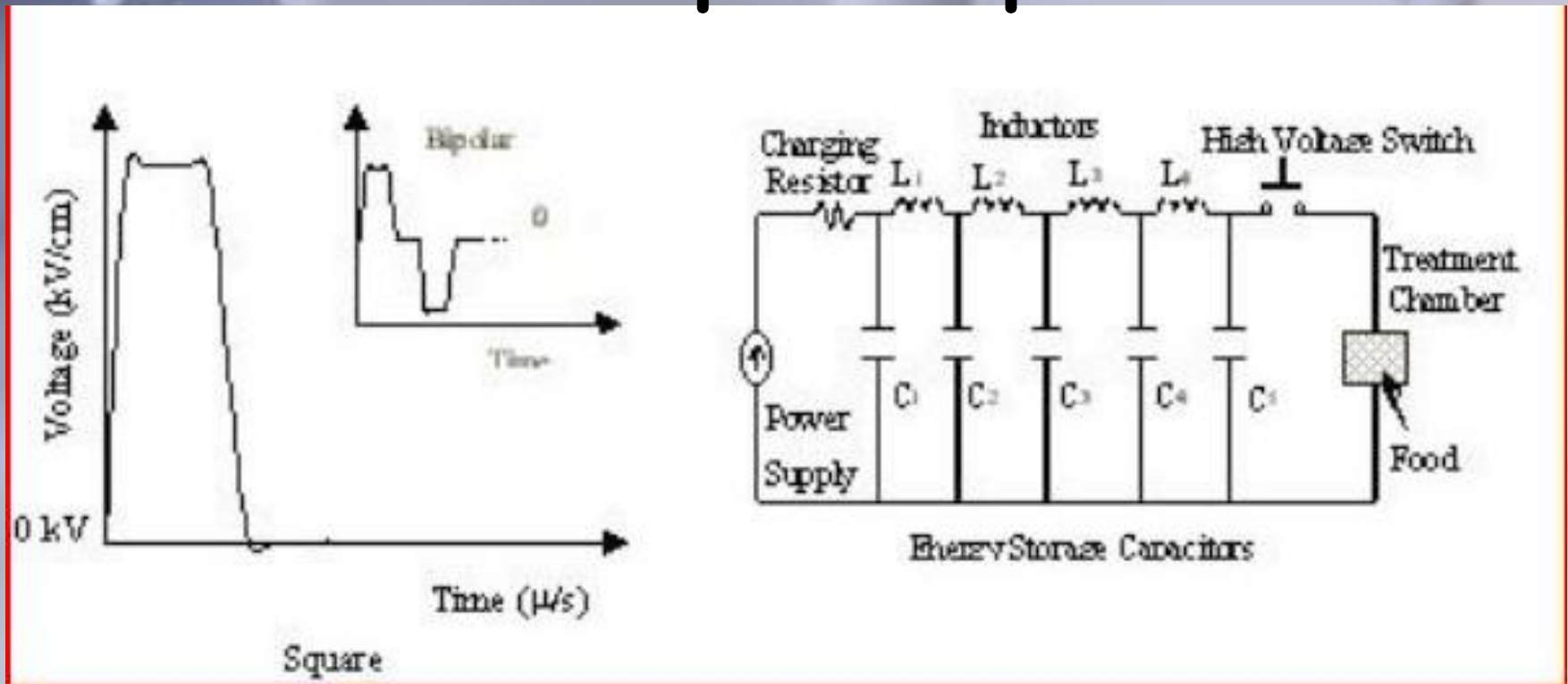
i Gram negativi sono più sensibili dei Gram
positivi.

Il campo elettrico può essere applicato in forma di:

- *onde di tipo esponenziale:* le più facili da generare e più facilmente applicabili a un vasto range di alimenti (succhi di arancia, latte, uova liquide).

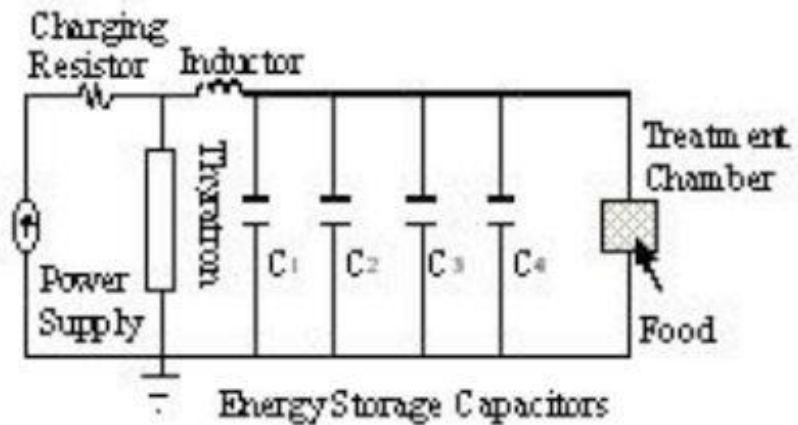
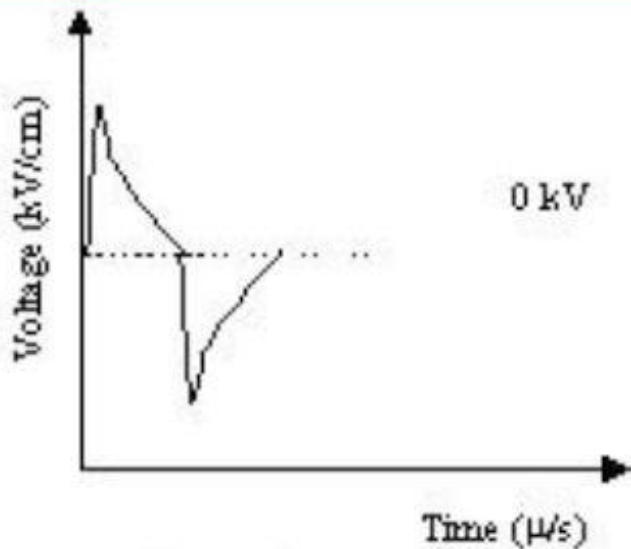


- *onde quadrate*: più efficienti da un punto di vista energetico ma richiedono circuiti più complessi.



- *onde bipolari*: le più efficaci.

-onde oscillanti: a parità di consumo (con le bipolari) energetico sono molto più efficienti



Fattori che influenzano l'effetto di trattamenti PEF:

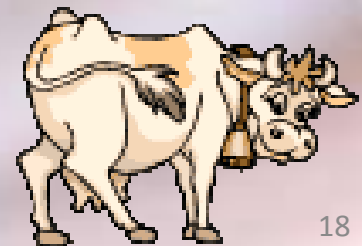


Fattori di processo

- Forza del campo elettrico (kV/cm)
- Numero e durata degli impulsi
- Forma degli impulsi
- Temperatura iniziale

Parametri relativi al prodotto

- Composizione
- Forza ionica
- aW
- Conduttività



Parametri relativi ai microorganismi

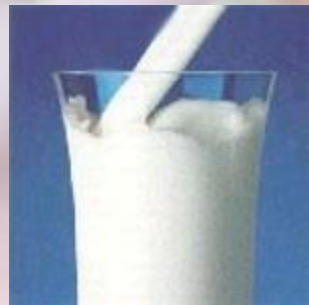
- Tipo di cellula
 - Forma
- Concentrazione
 - Fase





L'effetto di inattivazione risulta aumentato dalla combinazione di altri fattori stressanti, come sostanze antimicrobiche, acidi organici, blandi trattamenti termici

Necessità di acquisire informazioni riguardo alla capacità dei microrganismi di acquisire resistenza in seguito a trattamenti ripetuti



PEF- SYSTEM

L'impianto è un sistema in flusso continuo, altamente flessibile, per la sanitizzazione a freddo di alimenti liquidi.

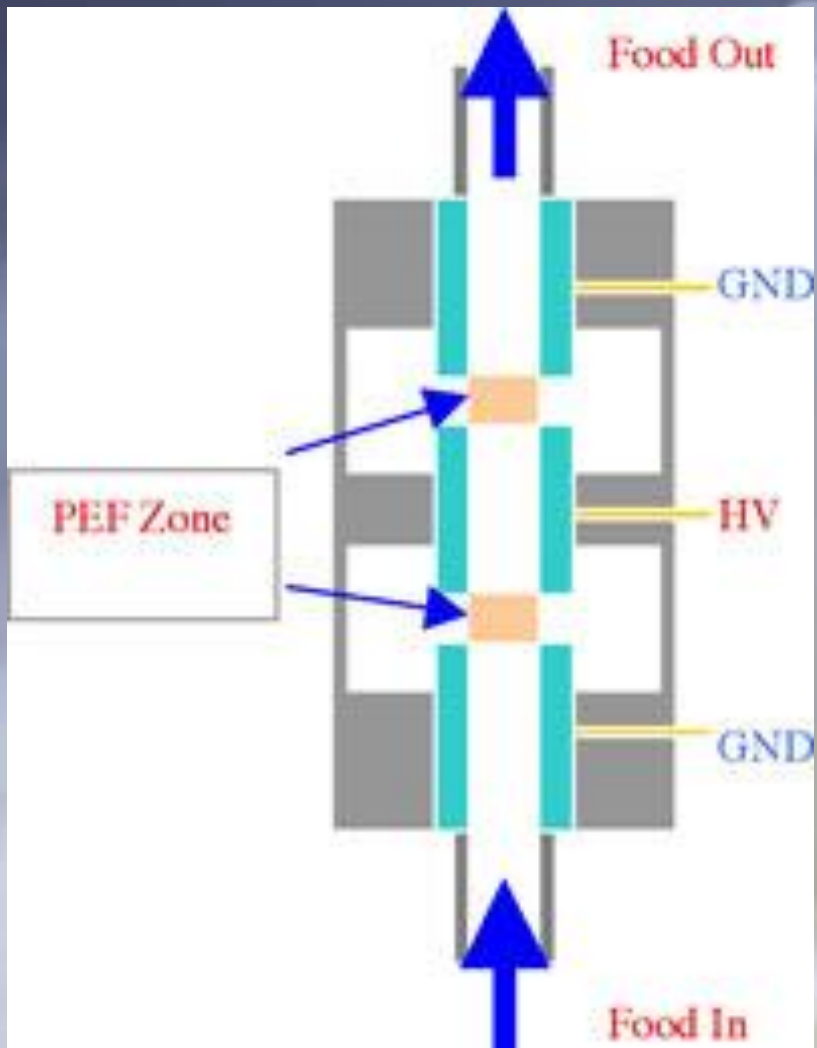
È costituito da un:

- **sistema di quattro camere di trattamento tubolari in serie**, collegate elettricamente ad un generatore di impulsi di campo elettrico di elevata intensità (massima intensità del campo elettrico 80 kV/cm) e di breve durata (microsecondi).

Il sistema è completato da:

- una **pompa peristaltica** utilizzata per pompare l'alimento attraverso il sistema;
- un **sistema di preriscaldamento** che consente il controllo della temperatura dell'alimento prima dell'ingresso nella camera di trattamento;
- un **sistema di raffreddamento** del prodotto finale;
- **strumentazione per la misura** e l'acquisizione della temperatura del prodotto lungo il circuito oltre che della tensione corrente in corrispondenza delle celle di trattamento.





Static

Continuous

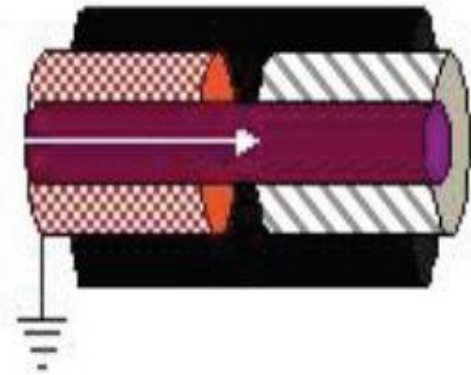
Parallel Plates



Co-axial



Co-field



High Voltage electrode



Ground electrode



Insulator



Food

Vantaggi



- rappresentano una tecnologia di stabilizzazione per alimenti liquidi, e consentono di preservarne gli attributi di qualità
- sono efficaci nell'inattivare molti microrganismi, in particolare lieviti ma anche batteri gram positivi e gram negativi;
- non sono in grado di inattivare la maggior parte degli enzimi alimentari, di denaturare le proteine, né di destabilizzare le emulsioni;

Vantaggi

- possono essere applicati come trattamento preliminare a successive operazioni tecnologiche, quali essiccamento e processi di estrazione.



Svantaggi



- tecnica ancora costosa
- inattivazione delle spore batteriche
- intenerimento di carne e pesce;
- La tecnologia non ha ancora raggiunto applicazioni industriali perché i risultati sono solo parzialmente soddisfacenti.



PEF: un trattamento del tutto sicuro!?!?



Un limite del trattamento è legato alla formazione di bolle di gas nei prodotti liquidi, che interferendo con la diffusione delle cariche elettriche, potenzialmente generano prodotti cancerogeni

Una soluzione: la pressurizzazione del liquido

Questa tecnologia può essere considerata un processo di pastorizzazione non termico, che soddisfa il concetto di "minimo trattamento tecnologico", basato sulla richiesta da parte del consumatore, di alimenti salutaris e "freschi" non contenenti additivi chimici.



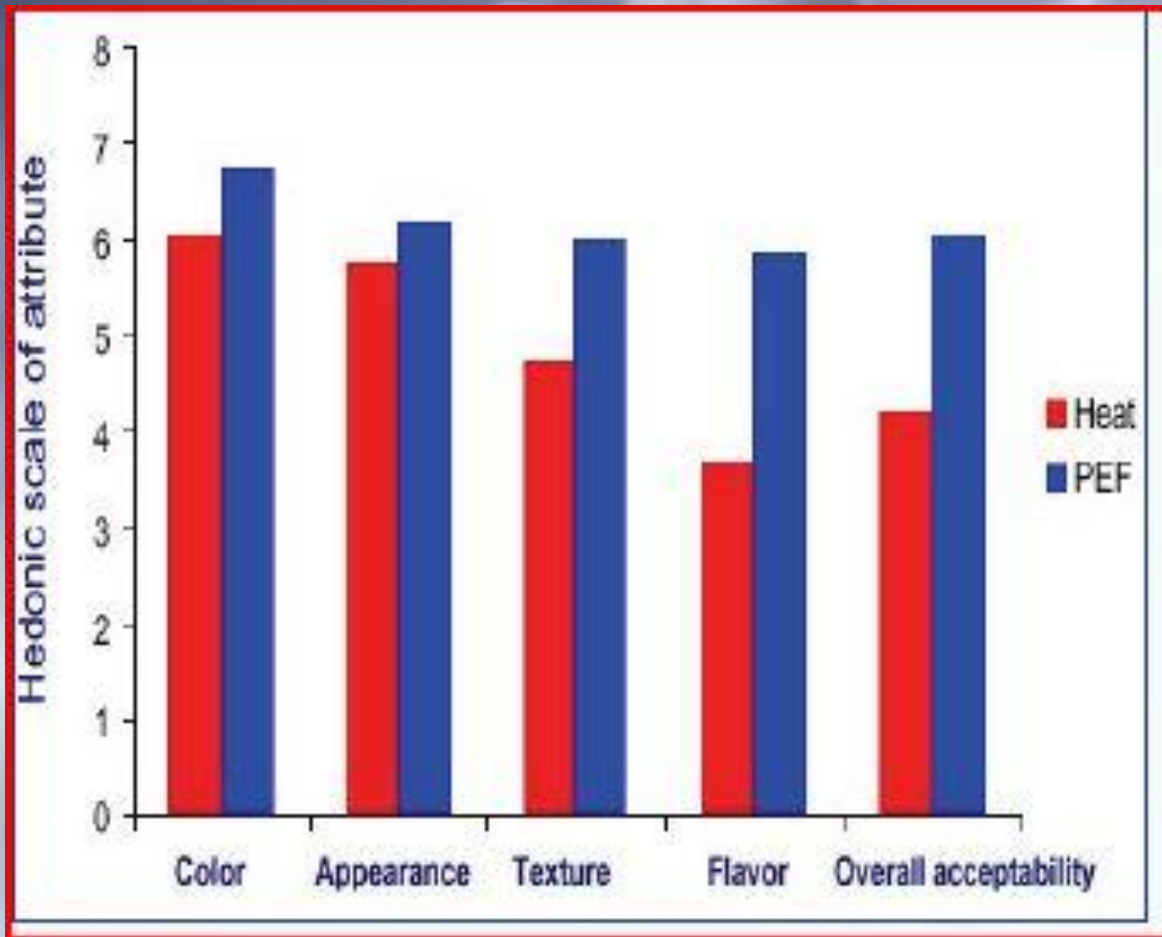
Studi PEF

- Gli effetti di processi a campi elettrici pulsati ad alta intensità (HI-PEF) sulla shelf life microbica e sui parametri qualitativi correlati di latte intero sono stati investigati e comparati alla pastorizzazione classica (75° C for 15 s) e a latte crudo durante la conservazione a 4°C...



- ... Il trattamento HIPEF ha assicurato la stabilità microbiologica del latte intero conservato per 5 giorni sotto refrigerazione. I valori di acidità iniziale, il pH e il contenuto in acidi grassi del latte così trattato non sono risultati influenzati dal trattamento e non sono state osservate lipolisi o proteolisi durante la prima settimana di conservazione. Le proteine del siero nel latte trattato HIPEF hanno presentato valori di ritenzione simili a quelli del latte pastorizzato!







Prodotto confezionato in vetro e venduto refrigerato.
 Ottenuto con un impianto della OSU, portata 200 L/hr
 La shelf-life è di 4 settimane

Table 2. Applications of high-intensity pulsed electric fields in food processing

Product	Treatment regime	Inoculate	Maximum inactivation; log reduction (D)	Chamber characteristics	Ref.
Fluid foods	12–25 kV/cm; 45–55°C; 25 pulses; 1–100 μ s	Natural microflora	Shelf life extended from 3 d to 1 week	Static chamber; parallel stainless steel electrodes; 2-cm gap; volume of 157 cm ³	18
Orange juice	33.6–35.7 kV/cm; 42–65°C; 35 pulses; 1–100 μ s	Natural microflora	Shelf life extended from 3 d to 1 week (5D)	Static chamber; parallel stainless steel electrodes; 2-cm gap; volume of 157 cm ³	18
<u>Orange juice</u>	6.7 kV/cm; 45–50°C; 5 pulses; 20 μ s	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Almost 5D	Static chamber; parallel carbon electrodes; 0.5-cm gap; volume of 25 cm ³	22
<u>Milk</u>	28.6 kV/cm; 42.8°C; 23 pulses; 100 μ s	<u>Escherichia coli</u>	3D	Static chamber; parallel stainless steel electrodes; 2-cm gap; volume of 157 cm ³	18
Milk	36.7 kV/cm; 63°C; 40 pulses; 100 μ s	Salmonella dublin	3D, resulting in 0 cfu/ml Salmonella dublin after treatment	Static chamber; parallel stainless steel electrodes; 2-cm gap; volume of 157 cm ³	18
Milk	22 kV/cm; 45–50°C; 20 pulses; 20 μ s	Lactobacillus brevis	4.6D	Static chamber; parallel carbon electrodes; 0.5-cm gap; volume of 25 cm ³	22

Skim milk	45 kV/cm; 35°C; 64 pulses; 1.8–6 μs	<i>Escherichia coli</i>	2D	Static chamber; parallel stainless steel electrodes; 0.51-cm gap; volume of 13.8 cm ³	27
Skim milk	15 kV/cm; 50°C; 98 pulses; 2 μs	Protease extracted from <i>Pseudomonas fluorescens</i>	60% RCZ	Continuous chamber; coaxial stainless steel electrodes; 0.6-cm gap; volume of 28.5 cm ³	31
Tryptic soy broth	11–18 kV/cm; 20–24°C; 20 pulses; 2 μs	Protease extracted from <i>Pseudomonas fluorescens</i>	80% RCZ	Continuous chamber; coaxial stainless steel electrodes; 0.6-cm gap; volume of 28.5 cm ³	31
<u>Yoghurt</u>	23–38 kV/cm; 63°C; 20 pulses; 100 μs	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	2D	Static chamber; parallel stainless steel electrodes; 2-cm gap; volume of 157 cm ³	18
Liquid egg	25.8 kV/cm; 37°C; 100 pulses; 4 μs	<i>Escherichia coli</i>	6D	Continuous chamber; coaxial stainless steel electrodes; 0.6-cm gap; volume of 11.87 cm ³	28
Pea soup	25–33 kV/cm; <53°C; 10–30 pulses; 2 μs	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<1.5D	Continuous chamber; coaxial stainless steel electrodes; 0.6-cm gap; volume of 28.6 cm ³	29
Pea soup	25–33 kV/cm; 53–55°C; 10–30 pulses; 2 μs	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	4.4D	Continuous chamber; coaxial stainless steel electrodes; 0.6-cm gap; volume of 28.6 cm ³	29
Simulated milk ultrafiltrate	30–45 kV/cm; 10–15°C; 10–50 pulses; 2 μs	Plasmin	90% RCZ	Continuous chamber; parallel stainless steel electrodes; 0.6-cm gap; volume of 8 cm ³	30
Sodium alginate	26 kV/cm; 45–50°C; 5 pulses; 20 μs	<i>Escherichia coli</i>	>4D	Static chamber; parallel carbon electrodes, 0.5-cm gap; volume of 25 cm ³	22

cfu, Colony-forming units

%RCZ, Percentage reduction in clear zone

Di solito si assume che la PEF sia un trattamento "tutto o niente", che non causa danno subletale: le cellule trattate sopravvivono o muoiono.

Da lavori con cellule di *E. coli* e *List. innocua* libere o attaccate a particelle di lattice sospese in tampone fosfato o latte con la stessa conduttività non è stata osservata nessuna differenza fra la sopravvivenza di cellule libere o immobilizzate né danno subletale.

Alcuni studi recenti mostrano che la PEF può causare danno subletale a *List. innocua*, *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*.

Table 2. Percent injured cells of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* after a PEF treatment at 20 kV/cm (initial load is 10^7 c.f.u./ml).

No. of pulses	Injured cells (%)	
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
10	36.16 ± 0.89	17.26 ± 0.88
20	35.92 ± 0.10	25.27 ± 1.48
30	38.73 ± 0.33	25.36 ± 2.96
40	43.36 ± 2.22	28.56 ± 0.92
60		30.86 ± 2.44

Tuttavia, anche se la PEF, non causa danno subletale, trattamenti combinati con batteriocine e PEF causano un incremento della letalità.

PEF e batteriocine

Trattamenti combinati con PEF hanno un effetto combinato...

- Quando le batteriocine sono presenti nel substrato durante o immediatamente dopo il trattamento PEF, i Gram -diventano sensibili alle batteriocine per danno delle membrana esterna;
- E' dubbio che l'effetto sinergico sia dovuto a danno subletale, ma le batteriocine potrebbero determinare la formazione di pori piu' grandi o con vita maggiore.

Per le batteriocine:le più testate sono nisina e pediocina AcH che d'altra parte sono anche le più efficaci.

PEF e batteriocine

gruppo	Bac	PEF	PEF+Bac
Gram -	-*	+	+++
Gram +	++	++	+++
Endospore	(+)	-	++
lieviti	-	+++	+++

*a meno che la membrana esterna non sia danneggiata

grandi range di concentrazioni cellulari o un gran numero di campioni o repliche.

Lait vol. 86 n. 3 (2006)

Tecnologia casearia

Campi elettrici pulsati e lavorazione in continuo del latte

“Lavorazione in continuo di latte magro tramite la combinazione di campi elettrici pulsati e trattamenti termici convenzionali: esiste un effetto sinergico sull’inattivazione microbica?,

di J. Floury et al., UMR 1253, Science et Technologie du Lait et de l’OEuf, Inra-Agrocampus Rennes (p. 202-212). Obiettivo della ricerca valutare l’effetto combinato di campi elettrici pulsati (PEF) con trattamenti termici sull’inattivazione di *Salmonella enteritidis* in latte magro con l’intento di verificare possibili sinergie che rendano

possibile disegnare regimi minimi di trattamento. I parametri di resistenza al calore (D_{θ} e z) sono stati misurati inizialmente in bagnomaria a temperatura controllata. L’inattivazione di *S. enteritidis* è stata quindi valutata impiegando PEF di 47 kV cm⁻¹/500°ns /60 s ed una temperatura di 62°C per 19 s ad una velocità di flusso di 5 L h⁻¹ in combinazione o singolarmente. I risultati ottenuti confermano come la combinazione delle due tecnologie porti ad una maggior efficienza di inattivazione rispetto ai singoli trattamenti. La letalità osservata risulta derivare dalla somma dei due effetti piuttosto che da un effetto sinergico.

Lait vol. 86 n. 3 (2006)

Nattokinasi nella maturazione del Cheddar

“Uso della nattokinasi, una serin proteasi subtilisina simile, per accelerare la proteolisi del Cheddar durante la maturazione”,

Effetti di campi elettrici pulsati sulle caratteristiche chimico-fisiche di isolati di proteine di soia

Le proteine di soia vengono comunemente utilizzate come ingrediente in diverse formulazioni alimentari a causa delle loro eccellenti caratteristiche funzionali e del loro buon valore nutrizionale. In questo lavoro sono stati investigati gli effetti di trattamenti con campi elettrici pulsati (PEF) sulle caratteristiche chimico-fisiche di isolati di proteine di soia (SPI). In particolare, dispersioni di SPI ad una concentrazione pari a 20 mg/ml sono state sottoposte a diversi test variando l'intensità (0-40 kV/cm) e la durata (0-547 μ s) del processo e mantenendo costanti l'ampiezza (2 μ s) e la frequenza (500 impulsi al secondo) degli impulsi. I risultati dimostrano che la solubilità, i surfidrili liberi (SH₂) e l'idrofobicità dei campioni aumentano all'incrementare dell'intensità e della durata del trattamento. Tuttavia, le condizioni più drastiche del processo

(i.e. intensità e durata, rispettivamente, superiori a 30 kV/cm e 288 μ s)

favoriscono la denaturazione e l'aggregazione (mediante legami non-covalenti) delle SPI. Ciò si traduce in una diminuzione della solubilità, del livello di SH₂ e dell'idrofobicità.

Il lavoro permette di concludere che attraverso il controllo delle condizioni operative del trattamento PEF è possibile modificare la struttura e la funzione delle SFI, in modo tale da ottenere ingredienti con caratteristiche desiderate.

Y. Li et al., LWT – Food Science and Technology, 40, 2007, 1167-1175





PEF e AMBIENTE



Questo processo:

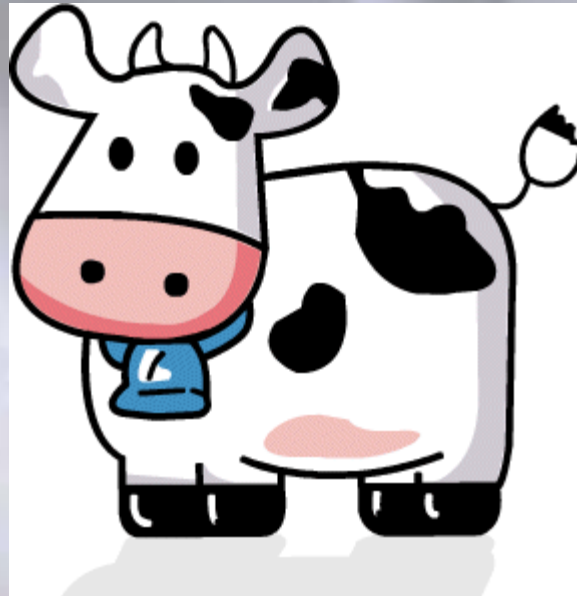
- 1) usa elettricità ordinaria,
- 2) rispetta gli standard di sicurezza .
- 3) non produce nessun prodotto dannoso per l'ambiente.



L'applicazione dei campi elettrici pulsati per il trattamento degli alimenti non è ancora regolamentata e richiede ancora un corretto HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)



Grazie dell'attenzione!



G.Coppola R.Pierro L.Silvestro

