

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 535**

51 Int. Cl.:

A23L 2/48 (2006.01)

A23L 2/50 (2006.01)

A23L 3/32 (2006.01)

C02F 1/48 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010 E 10713328 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2416672**

54 Título: **Procedimiento de permeabilización de membrana de células biológicas mediante el uso de un campo eléctrico pulsado**

30 Prioridad:

07.04.2009 FR 0952262

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2013

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SCHRIVE, LUC;
LUMIA, GUY y
PUJOL, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 404 535 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de permeabilización de membrana de células biológicas mediante el uso de un campo eléctrico pulsado

5 Campo técnico

La presente invención trata de un procedimiento de permeabilización de membrana de células biológicas mediante el uso de un campo eléctrico pulsado.

10 Este procedimiento encuentra aplicación muy particularmente en el campo de la pasteurización, es decir, en el campo del tratamiento de productos alimentarios (tales como leche, cremas, cerveza y zumos de frutas) consistente en la destrucción de microorganismos, especialmente patógenos, presentes inicialmente en estos productos.

15 El campo de la invención es por tanto aquel de la permeabilización de membrana de células biológicas y, en particular, de la destrucción de células biológicas mediante pasteurización.

Estado de la técnica anterior

20 Las técnicas de pasteurización han sido objeto de numerosos estudios en la técnica anterior, habida cuenta especialmente del auge de los productos de larga conservación, que requieren una presencia muy baja de microorganismos para poder ser consumibles de larga duración.

25 Tradicionalmente, la pasteurización consiste en calentar los alimentos a una temperatura definida durante un periodo definido de tal manera que se supere el umbral de termoresistencia de las bacterias patógenas que son el origen del deterioro de los alimentos y enfriar entonces rápidamente dichos alimentos calentados (a temperaturas de 3 a 4°C), de tal manera que se evite la multiplicación de las bacterias no se hayan destruido.

30 Este principio clásico constituye el objeto de numerosas variantes que pertenecen a la categoría de tratamientos denominados "tratamientos térmicos".

Los tratamientos térmicos para pasteurización pueden consistir en el uso como vector calefactor de los medios siguientes:

- 35 - radiaciones electromagnéticas, tales como radiaciones infrarrojas y radiaciones de microondas;
- calor derivado del fenómeno de efecto Joule creado en un tubo en cuyo interior circula el producto para pasteurizar;
- calor óhmico resultante del paso de corriente eléctrica a través del producto para pasteurizar.

40 Las temperaturas de pasteurización alcanzadas por vía térmica se gradúan tradicionalmente de 70 a 85°C. Sin embargo, pueden subsistir, después del tratamiento a estos intervalos de temperatura, ciertas formas patógenas tales como esporas incompatibles con productos destinados a alimentación.

45 Para destruir estas formas patógenas, una de las soluciones puede consistir en calentar los alimentos a temperaturas más elevadas que el intervalo anteriormente mencionado (por ejemplo, temperaturas superiores a 90°C). Sin embargo, el uso de temperaturas más elevadas está inevitablemente acompañado por una desnaturalización del producto tratado, tal como una desnaturalización de las proteínas presentes en el producto, lo que conlleva a menudo una pérdida de las calidades gustativas del producto.

50 Para remediar estos inconvenientes, se ha propuesto recurrir a procedimientos denominados "de baja temperatura", de tal manera que se conserve el sabor original del producto. Estos productos consisten en recurrir a medios de eliminación de bacterias patógenas distintos del calentamiento, que permitan tratar los alimentos a temperaturas que no superen los 60°C. Estos medios pueden consistir en radiaciones ionizantes, el uso de altas presiones y de luz pulsada utilizando un gas tal como gas carbónico.

55 Habida cuenta de lo que ya se ha propuesto en materia de procedimiento de permeabilización de membrana, y en particular de procedimiento de pasteurización, los autores se han propuesto desarrollar un nuevo procedimiento de permeabilización de membrana que permita, especialmente cuando se emplea enfocado a pasteurizar un producto alimentario, mejorar los índices de mortalidad de las células indeseables.

60 La publicación Food Chemistry, vol. 65, 1999, pág. 445-451 trata de un estudio sobre la influencia del uso de un campo eléctrico pulsado sobre los aromas y microorganismos contenidos en un zumo de naranja.

65 La publicación Journal of Food Engineering, vol. 83, 2007, pág. 41-46 trata de un estudio comparado de la pasteurización de un zumo de manzana mediante una técnica que implica un campo eléctrico pulsado y una técnica denominada térmica.

La publicación Food and Bioproducts Processing, vol. 85, nº 2, pág. 93-97 trata del estudio de la inactivación de *E. coli* en un zumo de manzana mediante el uso de un campo eléctrico pulsado.

- 5 La publicación Handbook of Fruits and Fruit Processing, pág. 95-114 se basa en el tratamiento de un zumo de naranja empleando un campo eléctrico pulsado.

Exposición de la invención

- 10 Así, la invención trata, según un primer objeto, de un procedimiento de permeabilización de membrana de células biológicas contenidas en un producto, empleándose dicho procedimiento en un dispositivo de tratamiento que comprende al menos una cámara de tratamiento emisora de un campo eléctrico pulsado, comprendiendo dicho tratamiento las etapas siguientes:

- 15 - una etapa de alimentación del dispositivo de tratamiento con producto que comprende dichas células biológicas a un caudal de alimentación predeterminado a partir de una unidad de alimentación que comprende dicho producto;

- una etapa de introducción del producto que comprende dichas células biológicas en dicha cámara de tratamiento a un caudal de introducción correspondiente al caudal de alimentación anteriormente mencionado, al que se añade el caudal de trasiego mencionado en la etapa de trasiego a continuación;

- una etapa de tratamiento de dicho producto introducido en dicha cámara por un campo eléctrico pulsado;

- 25 - una etapa de trasiego, a un caudal de trasiego predeterminado, del producto a la salida de dicha cámara de tal manera que se le reenvíe por detrás de dicha cámara y por delante de dicha unidad de alimentación.

Se entiende que el procedimiento de la invención es un procedimiento *in vitro* de permeabilización de membrana de células biológicas, es decir, que se emplea con un producto que se sitúa en el exterior de un organismo animal.

- 30 Los inventores han comprobado, sorprendentemente, que el procedimiento de la invención permite obtener un aumento significativo de la permeabilización de membrana de células y esto con al menos una cámara de tratamiento (cuantificándose el aumento en términos de tasa de mortalidad de las células) con respecto a un procedimiento que comprende uno o varios pasos del producto por la cámara anteriormente mencionada sin utilizar la etapa de trasiego tal como se menciona anteriormente, y esto para una misma energía específica utilizada.

- 35 Según la invención, las células tratadas en el ámbito del procedimiento pueden ser células procariotas o células eucariotas, pudiendo estar estas células vivas o muertas, enteras o por partes y ser de origen animal o vegetal.

- 40 En particular, estas células pueden proceder de organismos unicelulares o pluricelulares tales como bacterias (en particular eubacterias), hongos (en particular mohos), levaduras (como *Saccharomyces cerevisiae*), mohos, algas (en particular microalgas), virus y priones.

- Puede tratarse igualmente de orgánulos intracelulares o de compuestos internos de las células tales como mitocondrias, virus, proteínas o priones.

- 45 Las células pueden estar en fase vegetativa o en fase latente (tal como puede ser el caso de las esporas, tales como esporas bacterianas).

- 50 Las células para tratar están comprendidas en un producto, que puede ser un líquido alimentario tal como un zumo de fruta, un zumo de verdura, leche o agua.

Además, el producto que comprende dichas células puede contener tejidos, macromoléculas tales como biopolímeros, moléculas orgánicas o inorgánicas.

- 55 El campo eléctrico pulsado al que se somete el producto que comprende las células tiene por efecto permeabilizar dichas células.

- 60 Sin querer ligarse a teoría alguna, la exposición de una célula a un campo eléctrico externo induce una diferencia de potencial eléctrico a uno y otro lado de la membrana constitutiva de la célula. Cuando este campo es muy intenso (especialmente cuando es superior a 10.000 V/cm), puede inducir un potencial transmembrana de valor más elevado que el potencial natural de la célula. Cuando el potencial transmembrana alcanza un valor crítico, los fenómenos electrostáticos entre las moléculas cargadas a un lado y otro de la membrana conllevan la formación de poros en la membrana celular, aumentando así su permeabilidad. Cuando la formación de poros en la membrana celular es irreversible, esto puede conllevar la migración hacia el exterior del contenido celular, y así, la muerte de la célula.

Según la invención, el campo eléctrico pulsado, en función del índice de permeabilización deseado, presentará las características necesarias para la obtención de esta permeabilización en términos de valor de tensión, número de impulsos, forma de señal y energía específica suministrada por dicho campo.

- 5 El campo eléctrico pulsado se plasma tradicionalmente en forma de impulsos eléctricos resultantes, tradicionalmente, de descargas eléctricas de duración que puede graduarse desde 50 ns a 1 ms, por ejemplo 1 μ s, y que suministran una tensión que produce un valor de pico del campo eléctrico pulsado que va desde 5 kV/cm hasta 200 kV/cm. La tensión puede ir desde 100 V hasta 100.00 V.
- 10 El uso de impulsos eléctricos permite minimizar el fenómeno de calentamiento del producto por el efecto Joule y así la temperatura de este (tradicionalmente inferior a 50°C). Esto permite evitar la desnaturalización de los compuestos presentes en el producto, encontrándose dicha desnaturalización tradicionalmente con el empleo del procedimiento que implica altas temperaturas.
- 15 Los impulsos eléctricos se suministran dentro de una cámara de tratamiento que puede presentarse en forma de un recinto que comprende electrodos que permiten el paso de corriente en forma de impulsos eléctricos. Estos electrodos pueden ser planos, circulares, coaxiales, colineales, envolventes o presentar cualquier otra geometría apropiada.
- 20 Como se advierte precedentemente, el procedimiento comprende una etapa de alimentación del dispositivo de tratamiento con producto para tratar que comprende dichas células a un caudal de alimentación predeterminado a partir de una unidad de alimentación que comprende dicho producto.
- 25 Esta etapa consiste tradicionalmente en hacer pasar el producto para tratar de una unidad de alimentación, tal como un depósito, donde está contenido, a un conducto de alimentación que está ligado con la cámara de tratamiento.
- 30 Desde un punto de vista concreto, el producto para tratar alimenta el dispositivo de tratamiento a partir de una unidad de alimentación por un conducto de alimentación dotado eventualmente de una bomba de alimentación a un caudal de alimentación predeterminado, tal como un caudal graduado de 0,01 l/h a 10.000 l/h, por ejemplo un caudal de 20 l/h.
- 35 A continuación, el procedimiento de la invención comprende una etapa de introducción del producto que comprende dichas células biológicas en dicha cámara de tratamiento a un caudal de introducción correspondiente al caudal de alimentación anteriormente mencionado, al que se añade el caudal de trasiego mencionado en la etapa de trasiego a continuación.
- 40 Una vez se introduce el producto en la cámara de tratamiento, se somete a un campo eléctrico pulsado que se plasma mediante impulsos eléctricos que van a causar la permeabilización de las células contenidas en el líquido.
- 45 Los impulsos eléctricos son ventajosamente impulsos que pueden graduarse de 100 a 100.000 V, por ejemplo de 10.000 a 50.000 V y que suministran una energía suficiente para obtener la permeabilización deseada según el efecto biológico buscado. La energía suministrada por cada impulso está comprendida tradicionalmente entre 0,005 J y 500 J.
- 50 Así, cuando se desea obtener una permeabilización de células que genere la muerte de estas últimas (especialmente enfocada a una pasteurización o esterilización del producto), los parámetros de tratamiento, y especialmente el número total de impulsos suministrados a cada elemento de volumen (correspondiente al volumen de la cámara de tratamiento), se elegirán de tal manera que se suministre al producto una energía específica superior a 30 MJ/m³, de preferencia superior a 100 MJ/m³.
- 55 Para obtener la muerte de la célula, según la energía suministrada en cada impulso y según el volumen de la cámara de tratamiento, el número total de impulsos suministrados a cada elemento de volumen (correspondiente al volumen de la cámara de tratamiento) se ajustará para alcanzar los valores de energía específica deseados. Este número total de impulsos puede estar comprendido entre 10 y 1000.
- 60 Cuando se desea obtener la permeabilización de las células de tal manera que se aceleren los intercambios entre la célula y el medio circundante, los impulsos eléctricos emitidos por la cámara de tratamiento pueden elegirse de tal manera que suministren al producto durante todo el intervalo del procedimiento una energía específica inferior a 20 MJ/m³, por ejemplo que va de 1 a 20 MJ/m³. El número total de impulsos puede estar comprendido entre 2 y 100.
- 65 Se entiende que el experto en la materia, en función del índice de permeabilización deseado, elegirá las características de impulsos eléctricos apropiadas en términos de número de impulsos, tensión eléctrica y energía específica suministrada.
- El número de impulsos para aplicar a cada elemento de volumen puede repartirse en varias series.

A modo de ejemplo, cuando se considera que son necesarios 120 impulsos en cada elemento de volumen para tratar el producto, el número total de impulsos para aplicar podrá repartirse, por ejemplo, en 3 series, 6 series o 10 series, permitiendo cada serie aplicar, respectivamente 40, 20 o 12 impulsos.

5 Dentro de la cámara de tratamiento, el producto, especialmente cuando se presenta en forma de líquido, puede someterse a un régimen hidráulico turbulento. Este modo hidráulico es particularmente ventajoso. Efectivamente, la permeabilización de las células con una descarga eléctrica se efectúa preferiblemente sobre las caras de la membrana celular situadas frente a los electrodos. Cuando una célula está en movimiento caótico (lo que es el caso cuando el producto se somete a un régimen turbulento) con respecto a los electrodos y se somete a una serie de impulsos, experimentará impactos dispersos, lo que contribuirá a aumentar la eficacia del tratamiento en términos de permeabilización. A la inversa, se someterá una célula inmóvil con respecto a los electrodos a una concentración de impactos, lo que reducirá la eficacia del tratamiento.

15 Una vez realizada la etapa de tratamiento, se prevé, según el procedimiento de la invención, una etapa de trasiego, por delante de la cámara de tratamiento, del producto tratado en la cámara de tratamiento a un caudal de trasiego predeterminado, de tal manera que se reenvíe este producto trasegado por detrás de la cámara de tratamiento y por delante de dicha unidad de alimentación, mediante lo cual el producto trasegado se introduce de nuevo en la cámara de tratamiento y se somete de nuevo al campo eléctrico pulsado.

20 Según un modo particular de la invención, la etapa de trasiego se realiza mediante el desvío de al menos un bucle de circulación que liga la parte por delante de la cámara de tratamiento con la parte por detrás de esta. A la salida de la cámara de tratamiento, el producto tratado se trasega por la entrada del bucle de circulación situado por delante de la cámara y se inyecta por detrás de la cámara por la salida del bucle de circulación, presentándose este bucle de circulación en forma de un conducto de circulación.

25 El caudal de trasiego puede ser superior o igual al caudal de alimentación anteriormente mencionado.

Ventajosamente, el caudal de trasiego es superior al caudal de alimentación, por ejemplo de 2 a 100 veces mayor, de preferencia de 2 a 20 veces. Esto permite que cada fracción de producto pase al menos dos veces por la cámara de tratamiento.

El empleo de una etapa de trasiego según la invención presenta las ventajas siguientes.

35 Esto permite disminuir el fenómeno de cortocircuito hidráulico, es decir, la probabilidad de que una célula tomada del conjunto de la población celular tratada pase más rápidamente a la cámara de tratamiento que el resto de esta población.

40 Para una energía específica dada, se obtienen, gracias al empleo de la etapa de trasiego según la invención, mejores resultados en términos de permeabilización celular que para un procedimiento que presente un primer tratamiento del líquido mediante paso por una cámara de tratamiento, seguido de un segundo tratamiento en la misma cámara de tratamiento después de almacenarse en una cuba entre el primer tratamiento y el segundo tratamiento.

45 El procedimiento no comprende, ventajosamente, una etapa de almacenamiento en reposo del producto tratado antes de la etapa de trasiego, es decir, antes de la reintroducción de este en la cámara de tratamiento por la etapa de trasiego.

50 Otra ventaja proviene de un efecto inesperado ligado al hecho de que el número de impulsos suministrados a cada elemento de volumen se suministra en varias veces debido a la existencia del bucle de reciclaje. Se ha comprobado, sorprendentemente, que era más ventajoso, para un régimen hidráulico dado en la cámara de tratamiento y un número total de impulsos dados, repartir este número en varias veces en lugar de someter el producto para tratar al número total de impulsos de una sola vez, sin utilizar un bucle de reciclaje.

55 Según otro modo de realización de la invención, la etapa de trasiego puede realizarse mediante varios bucles de circulación cuyas entradas están situadas por delante de la cámara de tratamiento y cuyas salidas están situadas por detrás de la cámara de tratamiento.

El hecho de instalar varios bucles de circulación permite reducir la probabilidad de paso de células en situación de cortocircuito hidráulico tal como se define anteriormente.

60 Igualmente, el procedimiento de la invención comprende ventajosamente una etapa de extracción del producto tratado del dispositivo de tratamiento a un caudal de extracción correspondiente ventajosamente al caudal de alimentación anteriormente mencionado.

65 Se entiende por etapa de extracción una etapa consistente en extraer a la salida del dispositivo por delante de la cámara de tratamiento el producto, de tal manera que se evite la acumulación de producto en el dispositivo. El producto extraído y tratado puede recuperarse en una cuba de recogida.

Como se menciona anteriormente, el dispositivo de tratamiento comprende al menos una cámara de tratamiento, lo que significa que puede contener varias.

5 En este caso, las cámaras de tratamiento pueden juntarse unas con otras, produciéndose un ciclo de etapas, a saber, respectivamente etapa de introducción, etapa de tratamiento y etapa de trasiego tales como se explicitan anteriormente, en cada una de dichas cámaras de tratamiento.

10 El procedimiento de la invención puede emplearse con un dispositivo de tratamiento que comprende respectivamente:

- una unidad de alimentación del producto para tratar que se presenta, por ejemplo, en forma de una cuba en la que está contenido el producto para tratar;

15 - al menos una cámara de tratamiento que emite un campo eléctrico pulsado ligada con la unidad de alimentación por un conducto de alimentación;

- un conducto de salida situado por delante de la cámara de tratamiento;

20 - al menos un bucle de circulación cuya entrada está situada por delante de la cámara de tratamiento y que está conectado con el conducto de salida, y la salida está situada por detrás de la cámara de tratamiento y está conectada con el conducto de alimentación.

Pueden proporcionarse bombas en el conducto de alimentación y en el bucle de circulación.

25 El procedimiento de la invención, cuando la etapa de trasiego se efectúa por un solo bucle de circulación, puede realizarse a partir de un dispositivo de tratamiento 1 tal como se representa en la figura 1, que comprende respectivamente:

30 - una unidad de alimentación 2 que comprende el producto para tratar;

- un conducto de alimentación 3 que liga la unidad de alimentación con una cámara de tratamiento 5, en cuyo trayecto pueden interponerse bombas, tales como una bomba principal 7 y una bomba secundaria 9;

35 - una cámara de tratamiento 5 en la que se suministra un campo eléctrico pulsado;

- un conducto de salida 10 que liga la cámara de tratamiento 5 con una cuba de recogida 11 del líquido tratado;

40 - un bucle de circulación 13 que se plasma en forma de un conducto cuya entrada 15 está situada por delante de la cámara de tratamiento en el conducto de salida 10 y la salida 17 está situada por detrás de la cámara de tratamiento 5 en el conducto de alimentación 3, permitiendo este bucle el reenvío de al menos una parte del producto tratado por delante de la cámara de tratamiento con el fin de que esta parte se someta de nuevo a un campo eléctrico pulsado.

45 El procedimiento de la invención, cuando la etapa de trasiego se efectúa por varios bucles de circulación, puede realizarse a partir de un dispositivo de tratamiento 1 tal como se representa en la figura 2, que comprende respectivamente:

- una unidad de alimentación 2 que comprende el producto para tratar:

50 - un conducto de alimentación 3 que liga la unidad de alimentación 3 con una cámara de tratamiento 5 en cuyo trayecto pueden interponerse bombas tales como una bomba principal 7 y una bomba secundaria 9;

- una cámara de tratamiento 5 en la que se suministra un campo eléctrico pulsado;

55 - un conducto de salida 10 que liga la cámara de tratamiento 5 con una cuba de recogida 11 del líquido tratado;

60 - tres bucles de circulación, respectivamente 15, 17 y 19, que se plasman en forma de conductos cuyas entradas 21, 23 y 25 se sitúan por delante de la cámara de tratamiento 5 en el conducto de salida 10 y las salidas 27, 29 y 31 se sitúan por detrás de la cámara de tratamiento 5 en el conducto de alimentación 3, permitiendo estos bucles el reenvío de al menos una parte del producto tratado por delante de la cámara de tratamiento con el fin de que esta parte se someta de nuevo a un campo eléctrico pulsado, eventualmente mediante el desvío de una bomba o bombas que pueden ser comunes al conjunto de bucles de circulación o independientes para cada uno de los bucles.

65 En el bucle o bucles de circulación pueden insertarse uno o varios aparatos tales como intercambiadores de calor, intercambiadores de materia (por ejemplo, separadores de fase), intercambiadores de cantidad de movimiento (a

saber, dispositivos que permiten modificar y mejorar la circulación del fluido, tales como una bomba, un agitador móvil o un agitador estático).

5 El producto para tratar según el procedimiento de la invención puede presentarse en forma de un líquido que comprende células biológicas para permeabilizar, en forma de lodos o en forma de organismos pluricelulares tales como frutos.

10 Cuando se trata de un líquido, puede tratarse especialmente de agua, efluentes líquidos, lodos líquidos de estación de depuración, zumos de frutas, leche, huevos líquidos, salsas, sopas, compotas y purés.

Puede tratarse especialmente de un líquido que comprende orgánulos o moléculas procedentes de células biológicas, tales como mitocondrias, ADN o ARN.

15 Cuando se trata de lodos, puede tratarse especialmente de lodos de estación de depuración.

El procedimiento de la invención puede destinarse a diferentes usos tales como:

- pasteurización o esterilización de líquidos tales como agua, efluentes líquidos, zumos de frutas, leche, huevos líquidos, salsas, sopas, purés, compotas y purés;

- tratamiento de lodos de estación de depuración enfocado a eliminar ciertos organismos pluricelulares y microorganismos, antes de la difusión de estos lodos o la deshidratación antes del secado;

25 - tratamiento de células biológicas en el campo de la manipulación genética, enfocado a volverlas permeables a moléculas exógenas (tales como ARN, ADN, proteínas y virus);

- escisión de células de organismos pluricelulares, tales como frutos o algas, enfocada a facilitar su compresión posterior con el fin de obtener un zumo de frutas o un extracto graso.

30 El procedimiento de la invención está muy particularmente adaptado a la pasteurización o esterilización de un líquido.

35 Así, la invención trata igualmente de un procedimiento de pasteurización o esterilización de un producto, que comprende el empleo del procedimiento tal como se define a continuación, estando fijados los parámetros del campo eléctrico pulsado de tal manera que se obtenga una permeabilización de membrana de las células biológicas presentes en el líquido que conduzca a la muerte de estas últimas.

Puede tratarse especialmente de pasteurizar o esterilizar un zumo de fruta que comprende, como células biológicas, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

40 La invención se va a describir ahora con respecto a los ejemplos siguientes, dados a modo ilustrativo y no limitante.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 representa un ejemplo de un dispositivo de tratamiento que consta de un bucle de circulación que permite el empleo del procedimiento de la invención.

La figura 2 representa un ejemplo de un dispositivo de tratamiento que consta de tres bucles de circulación que permiten el empleo del procedimiento de la invención.

50 La figura 3 es una gráfica que ilustra el log (N/N₀) en función de la energía específica suministrada (en MJ/m³) para el ejemplo comparativo (curva a) y el ejemplo de la invención (curva b).

Exposición detallada de modos de realización particulares

55 Los ejemplos siguientes ilustran, por una parte, el empleo de un procedimiento que no entra en el ámbito de la invención (denominado ejemplo comparativo) y de un procedimiento según la invención (denominado ejemplo de la invención).

60 Para hacer esto, se utiliza un zumo de naranja contaminado por levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras son características de soluciones acuosas ricas en azúcar y ácidos y tienen tendencia a multiplicarse, provocando un desprendimiento de CO₂ procedente del metabolismo de oxidación de los azúcares, cuyo fenómeno vuelve el producto inadecuado para el consumo.

65 En un primer momento, se procede a la siembra de un zumo de naranja pasteurizado (a saber, inicialmente exento de levaduras), añadiendo a este zumo un inóculo concentrado con el fin de disponer para los ejemplos siguientes de

un zumo enriquecido en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* a un nivel de 10^7 microorganismos por mililitro (contados por un procedimiento estándar de crecimiento en medio específico de tipo gelosa).

Ejemplo comparativo

- 5 Se trata un mismo volumen de zumo de naranja (20 l) una primera vez con un dispositivo de tratamiento que comprende una cámara de tratamiento de $5,5 \text{ cm}^3$ de volumen que comprende electrodos planos paralelos inoxidables a un caudal de 25 l/h.
- 10 La señal eléctrica suministrada entre los electrodos es una señal de decrecimiento exponencial característica de la descarga de un condensador en la resistencia eléctrica que constituye la veta líquida presente en la cámara. El valor de pico del campo eléctrico se regula inicialmente a un valor próximo a 47 kV/cm, que produce una energía por impulso cercana a 5,5 J/impulso. La constante de tiempo τ de los impulsos definida por $\tau = RC$ es cercana a 700 ns, siendo R la resistencia eléctrica entre los electrodos y C el valor de capacidad de los condensadores de descarga.
- 15 El zumo tratado una primera vez ($n_r = 1$ tratamiento) se recupera en una bombona, se almacena de forma intermedia y se trata entonces a continuación una segunda vez haciéndole pasar, de nuevo, por el sistema de tratamiento en las mismas condiciones operativas ($n_r = 2$ tratamientos) que en el primer tratamiento.
- 20 Sin tener en cuenta el retardo necesario para el almacenamiento en reposo intermedio, la duración total del tratamiento es de 1h 36.
- 25 El número total de impulsos (n_{total}) (correspondiente cada uno a la descarga simple de un condensador) al que se somete cada elemento unitario de líquido (cuyo elemento corresponde al volumen de la cámara de tratamiento) en el primer tratamiento es igual a 120 e igualmente de 120 en el segundo tratamiento, lo que lleva el número final de impulsos a 240. Las características de los impulsos se reseñan en la tabla siguiente, a saber, un valor de pico de campo de 46,6 kV/cm y una energía específica suministrada a cada elemento unitario de líquido portada por m^3 de 120 MJ/m^3 , o sea 240 MJ/m^3 para los dos tratamientos.
- 30 Las características de cada tratamiento figuran en la tabla 1 siguiente.

n_r	n_{total}	Q (l/h)	E (kV/cm)	W_{espec} (MJ/m^3)	Log N/N ₀
1	120	25	46,6	120	-1,87
2	240	25	46,6	240	-4,4

correspondiendo n_r al número total de tratamiento del líquido para tratar;

- 35 correspondiendo n_{total} al número total de impulsos al que se somete cada elemento unitario de líquido (cuyo elemento corresponde al volumen de la cámara de tratamiento);
- correspondiendo Q (en l/h) al caudal de alimentación del líquido;
- 40 correspondiendo E (en kV/cm) al valor de pico del campo eléctrico liberado por cada uno de los impulsos eléctricos;
- correspondiendo W_{espec} (en MJ/m^3) a la energía específica suministrada a cada elemento unitario de líquido portada por m^3 ;
- 45 correspondiendo log N/N₀ al logaritmo decimal de la relación del número de microorganismos después del tratamiento (N) frente al número de microorganismos antes del tratamiento (N₀).

- 50 Resulta de esta tabla que el efecto de cada tratamiento es aditivo en el sentido de que cada tratamiento reduce el número de microorganismos del orden de 2 factores de 10. Por extrapolación, podría considerarse que tres tratamientos habrían permitido reducir 6 unidades logarítmicas la población de microorganismos a costa de 360 MJ/m^3 .

Ejemplo de la invención

- 55 Se prepara un mismo lote de 20 l de zumo de naranja que en el ejemplo comparativo anterior.
- Este zumo alimenta el dispositivo de tratamiento a razón de 20 l/h.
- 60 El dispositivo de tratamiento es similar al utilizado para el empleo del ejemplo comparativo expuesto anteriormente si no es porque se proporciona un bucle de circulación colocado a la salida de la cámara de tratamiento de $5,5 \text{ cm}^3$ de volumen. Las características del bucle de circulación son las siguientes: un diámetro de 8 mm y un volumen de 50 ml.

El caudal de circulación en este bucle se fija a 360 l/h, lo que significa que el caudal de introducción en la cámara de tratamiento es de 380 l/h.

Se realizan diferentes ensayos en los que:

- se trata el mismo volumen de zumo (20 ml);

- se fija el caudal de alimentación de zumo a 20 l/h, mientras que se fija el caudal de trasiego del bucle de circulación a 360 l/h;

- la duración del tratamiento es de 1 hora;

- el valor de pico del campo eléctrico se regula inicialmente a un valor próximo a 48 kV/cm, produciendo una energía por impulso próxima a 5,8 J/impulso, comparable al valor del ejemplo comparativo anterior;

- el número total de impulsos suministrados a cada elemento unitario de líquido (el cual corresponde al volumen de la cámara de tratamiento) tiene un valor determinado diferente para cada uno de los ensayos, lo que corresponde a una energía específica dada.

Los parámetros operativos de los ensayos empleados figuran en la tabla 2 siguiente.

Ensayo	n_{total}	$W_{\text{espec}} \text{ (MJ/m}^3\text{)}$	N_0	N	Log N/ N_0
1	59	62	$2,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	-1
2	79	80	$2,2 \times 10^6$	$7,75 \times 10^3$	-2,45
3	99	99	$2,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^2$	-4,17
4	119	118	$2,2 \times 10^6$	1	-6,34

correspondiendo n_{total} al número total de impulsos suministrados a cada elemento unitario de líquido (que corresponde al volumen de la cámara de tratamiento);

correspondiendo W_{espec} (en MJ/m^3) a la energía específica suministrada a cada elemento unitario de líquido portada por m^3 ;

correspondiendo N_0 al número de microorganismos antes del tratamiento;

correspondiendo N al número de microorganismos después del tratamiento.

Resulta de esta tabla que se obtiene una inactivación superior a 2,4 unidades logarítmicas para una energía específica de 80 MJ/m^3 (mientras que en el caso del ejemplo comparativo, hacía falta una energía específica de más de 120 MJ/m^3 para obtener dicha inactivación), que se obtiene una inactivación superior a 4 unidades logarítmicas para una energía específica de 99 MJ/m^3 y que, para una energía específica de 118 MJ/m^3 , se obtiene una inactivación de 6,34 unidades logarítmicas (mientras que para una energía específica de 120 MJ/m^3 se obtenía únicamente una inactivación del orden de 2 unidades logarítmicas).

La figura 3 representa una gráfica que ilustra el log (N/ N_0) en función de la energía específica W (en MJ/m^3) para los valores obtenidos para el ejemplo comparativo (curva a) y el ejemplo de la invención (curva b).

En conclusión, resulta que pueden obtenerse 4 unidades logarítmicas de inactivación (o sea 10.000 veces menos microorganismos vivos después del tratamiento que antes) con 2,4 veces menos energía en el ámbito del ejemplo de la invención. Resulta igualmente que, para un mismo valor de energía específica (en este caso, 120 MJ/m^3), se obtiene una ganancia de 4 unidades logarítmicas en el ámbito del ejemplo de la invención con respecto al ejemplo comparativo.

La instalación de un bucle de circulación permite así acceder a resultados superiores a los obtenidos mediante pasos múltiples del mismo volumen de zumo para tratar, como se explicita en el ejemplo comparativo.

Así, el procedimiento de la invención permite considerar una reducción significativa tanto de los costes de inversión como de funcionamiento al reducir el riesgo de reviviscencia de microorganismos.

Con relación a un procedimiento que no consta de bucle de circulación, se minimiza el volumen muerto (es decir, el volumen en reposo de líquido tratado, tal como es el caso del ejemplo comparativo, donde el líquido tratado antes de su segundo paso se deposita en una cuba intermedia).

La originalidad de la invención proviene también del efecto inesperado del procedimiento, en el que el bucle de circulación no actúa solamente como un aparato de mezclado o aumento del régimen hidráulico.

A continuación, se compara la diferencia de mortalidad celular para valores de energía específica comparables.

El producto tratado está constituido por zumo de naranja contaminado con levaduras similares las precedentes. El producto ensayado se trata en la misma cámara de tratamiento para un valor de pico de campo eléctrico de 48 kV/cm, produciendo una energía por impulso igual a 5,7 J. Los resultados de inactivación se comparan para una energía específica suministrada de 100 MJ/m³ (o sea, un número total de impulsos de 100).

En un primer caso, en ausencia de bucle de circulación con una carga de 20 l y un caudal de alimentación de 25 l/h, por extrapolación de los valores de la curva ilustrada en la figura 3, la inactivación es de 1,5 unidades logarítmicas.

En un segundo caso, siempre en ausencia de un bucle de circulación, con una carga de 500 l con un caudal de alimentación de 500 l/h, se obtiene un valor experimental de $\log N/N_0 = 2$ procedente de un mejor régimen hidrodinámico equivalente a una mejor agitación.

Si se hace remisión a la figura 3, con una carga de 20 l y un caudal de alimentación de 20 l/h, cuando se emplea el bucle de circulación para un caudal total que atraviesa la cámara de tratamiento de 380 l/h (360 l/h en el bucle y 20 l/h procedente de la alimentación), o sea un régimen hidráulico ligeramente menos favorable que 500 l/h, se obtiene una inactivación $\log N/N_0$ de 5. Por tanto, el efecto favorable sobre la mortalidad celular proviene esencialmente del número de pasos por el bucle de circulación y no del régimen hidráulico.

Los resultados figuran en la tabla 3 siguiente.

Caudal de alimentación Q (l/h)	Bucle de circulación	Caudal de introducción en la cámara (l/h)	W_{espec} (en MJ/m ³)	Log (N/N ₀)
25	No	25	100	1,5
500	No	500	100	2
20	Sí	380	100	5

Podrían proporcionarse varios bucles de circulación, por ejemplo 2 o 3 bucles de circulación.

En la tabla 2 anterior, se puede observar que, para una energía específica de 118 MJ/m³, con un solo bucle de circulación, los microorganismos pasan casi sin riesgo de pasar con cortocircuito hidráulico, a saber, en este caso con una probabilidad de paso cercana a 1 por cada 2×10^6 . Si se añade un segundo bucle de circulación, con todo lo demás igual, la probabilidad de paso directo de un microorganismo será cercana a 1 por cada $(2 \times 10^6)^2$, o sea de 1 por cada 4×10^{12} . Si se añade un tercer bucle de circulación, la probabilidad de paso directo de un microorganismo será cercana a 1 por cada $(2 \times 10^6)^3$, o sea 1 por cada 8×10^{18} .

Así, con un procedimiento según la invención, a partir de un líquido de alimentación contaminado tradicionalmente con un nivel de 10^6 a 10^7 microorganismos por mililitro, se puede casi anular la posibilidad de paso de un microorganismo en cortocircuito hidráulico y, por tanto, prevenirse contra cualquier riesgo de reviviscencia de un líquido pasteurizado por campos eléctricos pulsados.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de permeabilización de membrana de células biológicas contenidas en un producto, empleándose dicho procedimiento en un dispositivo de tratamiento que comprende al menos una cámara de tratamiento emisora de un campo eléctrico pulsado, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
5
 - una etapa de alimentación del dispositivo de tratamiento con producto que comprende dichas células biológicas a un caudal de alimentación predeterminado a partir de una unidad de alimentación que comprende dicho producto;
- 10
 - una etapa de introducción del producto que comprende dichas células biológicas en dicha cámara de tratamiento a un caudal de introducción correspondiente al caudal de alimentación anteriormente mencionado, al que se añade el caudal de trasiego mencionado en la etapa de trasiego a continuación;
 - una etapa de tratamiento de dicho producto introducido en dicha cámara por un campo eléctrico pulsado;
- 15
 - una etapa de trasiego, a un caudal de trasiego predeterminado, del producto a la salida de dicha cámara de tal manera que se le reenvíe por detrás de dicha cámara y por delante de dicha unidad de alimentación.
202. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células biológicas se eligen entre células procariotas o células eucariotas, pudiendo estar estas células vivas o muertas, enteras o por partes y ser de origen animal o vegetal.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células biológicas proceden de organismos unicelulares o pluricelulares elegidos entre bacterias, hongos, levaduras, mohos y algas.
254. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el campo eléctrico pulsado se plasma en forma de impulsos eléctricos resultantes de descargas eléctricas de una duración que puede graduarse de 50 ns a 1 ms y que suministran una tensión que produce un valor de pico del campo eléctrico pulsado que va de 5 kV/cm a 200 kV/cm.
305. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto, especialmente cuando se presenta en forma de un líquido, se somete a un régimen hidráulico turbulento.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de trasiego se realiza por el desvío de al menos un bucle de circulación que liga la parte por delante de la cámara de tratamiento con la parte por detrás de esta.
357. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el caudal de trasiego es superior al caudal de alimentación.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el caudal de trasiego es de 2 a 100 veces mayor que el caudal de alimentación.
409. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que el caudal de trasiego es de 2 a 20 veces mayor que el caudal de alimentación.
4510. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que no comprende etapa de almacenamiento en reposo del producto tratado antes de la etapa de trasiego.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que igualmente comprende ventajosamente una etapa de extracción del producto tratado del dispositivo de tratamiento a un caudal de extracción correspondiente, de preferencia, al caudal de alimentación mencionado anteriormente.
5012. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto para tratar es un líquido que comprende células biológicas, un lodo que contiene células biológicas o un organismo pluricelular tal como un fruto.
5513. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto para tratar es un líquido que comprende orgánulos o moléculas procedentes de células biológicas, tales como mitocondrias, ADN o ARN.
6014. Procedimiento según la reivindicación 12 o 13, en el que el líquido se elige entre agua, efluentes líquidos, lodos líquidos de estación de depuración, zumos de fruta, leche, huevos líquidos, salsas, sopas, compotas y purés.
6515. Procedimiento de pasteurización o esterilización de un producto que comprende células biológicas para eliminar, que comprende una etapa de empleo del procedimiento tal como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el producto es un zumo de fruta que comprende, como células biológicas, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

