

Stabilisation microbiologique des vins par utilisation de champs électriques pulsés

Microbiological stabilization of wines by use of pulsed electric fields

François Davaux¹, Jean-Baptiste Leroy² et Loïck Royant²

¹IFV – Institut Français de la Vigne et du Vin, 81310 Lisle-sur-Tarn, France

²Leroy Biotech, 31650 Saint-Orens-de-Gameville, France

Abstract. For more than ten years, pulsed electric field (PEF) technology has been the subject of a growing number of publications and patents. The technology previously reserved for laboratories is becoming more and more popular and is now a success in the food industry. Since 2015, with the help of the Occitania region, we have been studying the use of the PEF on the microbiological stability of wines on a semi-industrial scale from 5 to 12 hl/hour. This low thermal and energy consuming physical technology requires no inputs to ensure the destruction of microorganisms and microbial stabilization of wines. These tests are performed with a 7 kV/cm electric field generated between the 2 electrodes of the treatment chambers. The objective is to ensure the microbial stabilisation of wines not exceeding 50 °C and to cool the wine immediately after treatment without maintaining it at high temperature. The study of the effectiveness of PEF on yeast destruction is carried out during the mutage of sweet wines. The first results obtained show a very good efficiency of the yeast treatment with an instant cessation of alcoholic fermentation and a decrease in the yeast population ranging from -3 to -5 Log. No SO₂ addition is then required. On wines contaminated by *Brettanomyces*, the tests show an almost total elimination (< 1/100 ml) of these yeasts by the PEF treatment. These tests also showed that a higher energy level is required to eliminate all lactic acid bacteria from wine. No effects on the physico-chemical characteristics of the wines were found. The impact on the organoleptic characteristics of wines is ongoing. An optimization of the electrical parameters is still necessary.

1. Introduction

L'utilisation des Champs Electriques Pulsés (CEP) fait l'objet depuis une dizaine d'années de nombreux travaux [1, 2] en Œnologie, et est axée principalement sur l'extraction des polyphénols [3, 4, 5] des raisins, et dans une moindre mesure sur l'extraction des précurseurs aromatiques des raisins blancs. Jusqu'à très récemment, la stabilisation microbiologique des moûts [6, 7] et des vins [8] par les CEP était très peu étudiée. A ce jour, l'ensemble des études sur la gestion des micro-organismes des moûts et des vins par l'utilisation de CEP, est réalisé en conditions de laboratoire [9, 10] sur quelques litres de vins avec des débits très faibles de l'ordre de la dizaine de litres / heure de vin traité. Depuis 2016, l'IFV, en collaboration avec un industriel, développe et teste un pilote semi-industriel, permettant un traitement en continu du vin par les CEP à un débit pouvant aller jusqu'à 1 200 l/h.

La technique des CEP est basée sur l'application d'un champ électrique haute tension (0,3-80 kV/cm) sous forme de courtes impulsions [10, 11] de quelques microsecondes (µs), à plusieurs millisecondes (ms) à des fréquences variables [12], conduisant à la perméabilisation des cellules [13, 14] (électroporation) avec un chauffage minimum du produit. La valeur du champ électrique peut s'exprimer comme étant le rapport de la tension appliquée sur la distance inter-électrode, et s'exprime communément en kilovolts par centimètre (kV/cm).

Lorsque les cellules biologiques sont soumises à un champ électrique, leur potentiel transmembranaire augmente jusqu'à un seuil critique, où les phénomènes de répulsion entre les molécules chargées de la membrane cellulaire entraînent la formation de pores [16, 17, 18], ce qui accroît la perméabilité de la membrane (perméabilisation).

Figure N°1 : Traitement d'une levure de type *Saccharomyces cerevisiae* par des Champs Electriques Pulsés – Harrison et al 1990-Washington State University

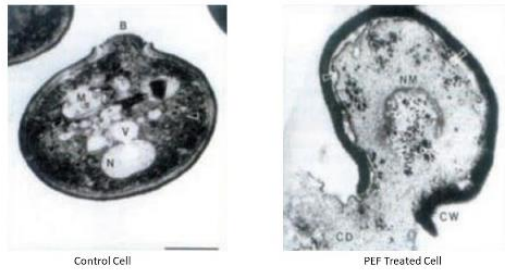
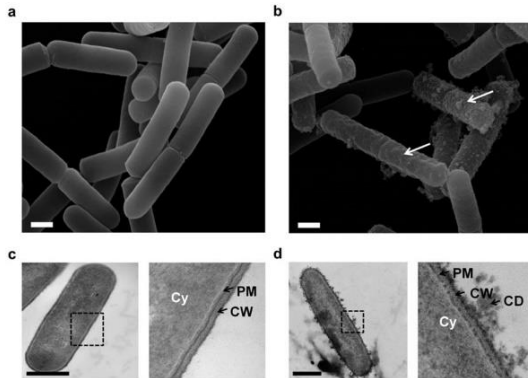


Figure N°2 : (a) SEM image showing population of untreated bacteria. Bacteria are smooth. (b) Pulsed bacteria were visualized by SEM after PEF exposure (1000 micropulses at 7.5 kV/cm). White arrows indicate surface damage. (c) TEM image of untreated *Bacillus pumilus*. Inset shows bacterial architecture with the cytoplasm (Cy), plasma membrane (PM) and cell wall (CW). (d) TEM image of a pulsed bacterium after PEF. Inset shows the expulsion of cell-debris (CD), damage to the PM and the CW. Scale bars: 500 nm. Flavien Pillet et al 2015 – Université de Toulouse



En fonction des caractéristiques du champ électrique (tension et durée des impulsions principalement, et nombre d'impulsions reçues), la formation des pores peut être réversible (traitement des raisins), permettant ainsi l'extraction des composés intra cellulaires d'intérêt, ou irréversible conduisant à la rupture de la paroi cellulaire et au vidage total de son contenu, entraînant ainsi la mort de la cellule microbienne (stabilité microbiologique).

En fonction de l'objectif - extraction des polyphénols ou stabilité microbienne - l'efficacité du traitement dépendra des paramètres de traitement tels que l'intensité du champ électrique, le nombre d'impulsions reçues, la durée des impulsions, le type de polarité des impulsions et la température.

Pour que le traitement soit efficace sur la destruction des microorganismes, l'énergie apportée par les CEP doit être environ de 100 kJ/l de vin [19] pour détruire des levures de types *Saccharomyces Cerevisiae* ou *Brettanomyces*, et supérieure à 160 kJ/l pour détruire des bactéries de type GRAM+ comme les bactéries Lactiques [20, 21].

2. Matériel et méthode

2.1 Description du matériel

L'équipement de traitement du vin par des champs électriques pulsés comprend 2 parties :

- Le générateur de champs électriques pulsés (CEP)
- Les chambres de traitement du vin, au nombre de 4

Le générateur de CEP est conçu pour délivrer des impulsions bipolaires de forme carrée d'une durée de quelques μ s à 100 ms sous

une tension allant de 400 V/cm à 7 kV/cm. Le générateur d'impulsion peut être utilisé aussi bien pour le traitement de la vendange que pour la stabilisation microbienne des vins. La durée des impulsions et leur fréquence peuvent être programmées en fonction des besoins de l'utilisateur. Le générateur est conçu pour un débit de 100 à 4 000 l/h en fonction de la puissance électrique disponible. La stabilisation microbiologique des vins, nécessite un champ électrique beaucoup plus intense avec un minimum de 7 kV/cm, comparé aux 400 V/cm pour le traitement des raisins. Pour ces débits, le générateur présente un faible encombrement, et demande une surface au sol de moins de 2 m².

Figure N° 3 : Forme des impulsions et caractéristiques du générateur de CEP

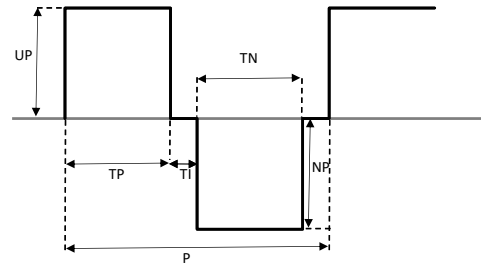


Tableau N°1 : Caractéristiques des impulsions électriques

Paramètres	Repère	Valeurs
Tension de travail	UP et NP	1 800 Volts
Durée des impulsions	TP et TN	5 μ s à 5 ms
Type d'impulsions		Carrée
Polarité des impulsions		Bipolaire
Durée entre impulsions	TI	100 à 500 μ s
Champ électrique		7 kV/cm (entre électrodes)
Fréquence des impulsions	P	250 à 1 000 Hz

Les chambres d'impulsions au nombre de 4 sont montées en série et sont dimensionnées pour un débit maximum de 1 200 l/h. Ces chambres de traitement sont traversées de façon continue et régulière par du moût ou du vin. Elles peuvent être placées directement sur une canalisation lors du transfert du vin d'une cuve à l'autre.

Tableau N° 2 : Caractéristiques des chambres d'électroporation

Paramètres	Valeurs
Nombre de chambre de traitement	4
Type d'électrodes	Plane
Ecartement des électrodes	3 mm

Figure N°4 : Quatre chambres de traitement du vin montées en série



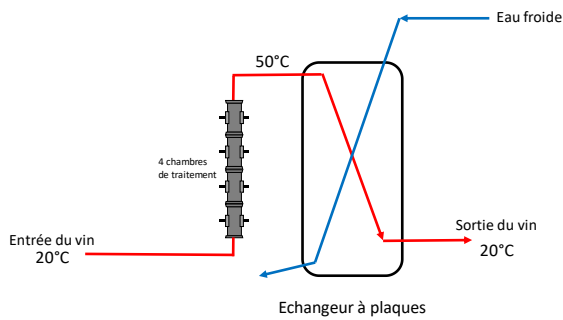
Le suivi des essais se fait par enregistrement de la température avant et après passage dans les 4 chambres et de la consommation électrique.

2.2 Dispositif expérimental

Les 4 chambres de traitement sont alimentées en continu par une pompe volumétrique à des débits de 5 à 12 hl/h en fonction des essais. L'intérêt de la stabilisation microbiologique des vins par

l'utilisation de champs électriques pulsés, est de détruire les micro-organismes par l'effet « électrique », tout en limitant l'élévation de température du vin au cours du traitement. Dans tous nos essais, la durée des impulsions est adaptée pour que l'élévation de température ne dépasse pas la température maximale souhaitée. La majorité des tests est réalisée pour une température maximale de 40°C, 50°C, 60°C et 65°C. Pour ces essais la configuration des chambres de traitement et de l'échangeur est présentée dans le schéma ci-dessous.

Figure N°5 : Montage des 4 chambres de traitement en série avec refroidissement par un échangeur à plaque



L'objectif est de rester à une température inférieure à la flash pasteurisation (72°C sur vin et 76°C pour un arrêt de fermentation) sans chambrage (20 à 30 secondes de chambrage pour la Flash-pasteurisation). Pour la stabilisation microbienne par des CEP, le vin est immédiatement refroidi à sa température initiale par un échangeur à plaques.

Pour certains essais, où nous voulons augmenter l'énergie transmise au vin tout en limitant l'élévation de température (respect des températures notées ci-dessus) et la consommation énergétique, nous séparons les 4 chambres de traitement en 2 groupes de 2 chambres en intercalant un échangeur à plaques entre le 1^{er} et le 2^{ème} groupe de chambres de traitement. Le vin entrant est préchauffé par le vin sortant du 1^{er} groupe de 2 chambres, et le vin sortant du premier groupe de 2 chambres est refroidi par le vin entrant, avant d'être traité par le second groupe de 2 chambres, puis le vin est immédiatement refroidi à la température initiale. Le préchauffage du vin avant traitement permet de sensibiliser les micro-organismes et de rendre plus efficace le traitement par les CEP [22].

Figure N°6 : Montage des chambres de traitement en 2 groupes de 2 chambres avec refroidissement intermédiaire

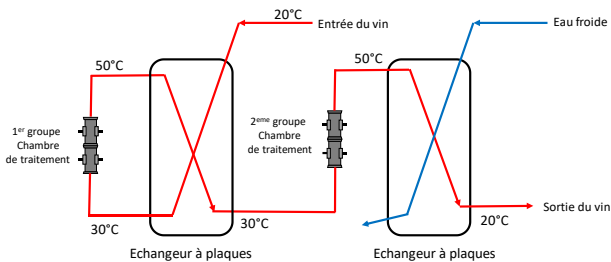
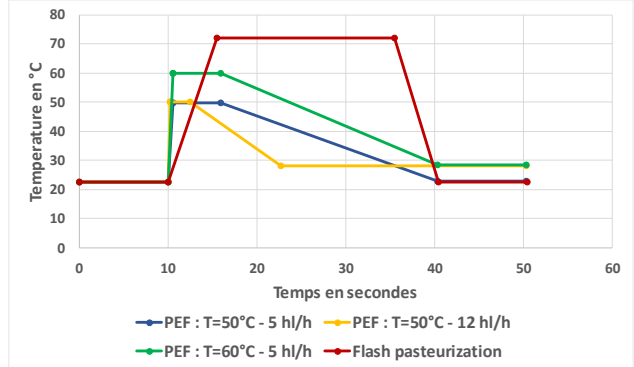


Figure N°7 : Démonstrateur de stabilisation microbienne des vins par des CEP (chambres de traitement + générateur) couplé à un échangeur de chaleur à plaques



Le générateur de CEP est dimensionné pour un traitement d'environ 4 000 l/h. Les chambres de traitements permettent un débit maximal de 1 200 l/h. L'augmentation du débit, se fait par la mise en parallèle des groupes de chambres de traitement sur le même générateur.

Figure N°8 : Comparaison du profil de température durant le traitement du vin par des CEP à 5 et 12 hl/l et la flash pasteurisation



Le traitement des vins par les champs électriques pulsés permet une montée en température immédiate (temps de passage dans les chambres de traitement) avec des températures moins élevées que la Flash pasteurisation, et surtout aucun maintien en température, contrairement à la Flash pasteurisation où il y a un temps de chambrage de 20 à 30 secondes.

2.3 Les différents micro-organismes étudiés

Les essais sont réalisés sur les principaux micro-organismes rencontrés dans les vins, levures de type *Saccharomyces Cerevisiae* et *Brettanomyces* (levure d'altération) et bactéries lactiques.

Chaque famille de micro-organismes possède une sensibilité spécifique aux champs électriques pulsés [23]. La taille des micro-organismes a également un effet direct sur la sensibilité des micro-organismes aux CEP. Les micro-organismes les plus gros sont plus sensibles aux CEP, ce qui a pour conséquence une plus grande sensibilité des levures par rapport aux bactéries. Les bactéries, de type GRAM+ comme les bactéries lactiques sont plus difficiles à détruire que les bactéries acétiques GRAM- [20, 21]. Les essais sur levures de type *Saccharomyces Cerevisiae* ont été réalisés dans le cadre d'un arrêt de fermentation sans utilisation de SO₂. Les moûts ont été préalablementensemencés avec des levures sèches actives du commerce. Le traitement par les CEP est réalisé au stade de mutage choisi sans ajout de SO₂.

Pour les essais réalisés sur *Brettanomyces*, nous avons réalisé les essais sur des vins naturellement contaminés par *Brettanomyces*, et sur des vinsensemencés avec des *Brettanomyces* après une phase de ré-acclimatation et de multiplication dans le vin.

Les essais sur bactéries lactiques sont réalisés sur des vins en cours de fermentation malolactique après une inoculation naturelle.

3. Résultats - discussion

3.1 Arrêt de fermentation alcoolique par destruction des levures de type *Saccharomyces Cerevisiae* par des CEP

Cet essai de mutage a pour objectif de comparer 2 débits de traitement des vins par les CEP, et l'application de 2 niveaux d'énergie. Le traitement est réalisé à 29 g/l de sucre résiduel. La température des vins lors du traitement est de 20°C, en fonction des niveaux d'énergie appliqués (73 et 107 kJ/l). L'élévation de température du vin est de +20°C et +30°C. Après remise à la température initiale, les vins sont mis en chambre froide à 5°C afin de faire sédimenter les levures.

L'arrêt de fermentation est immédiat pour l'ensemble des vins traités par les CEP. Seul le témoin poursuit sa fermentation alcoolique et celle-ci s'achève après 38 jours. Le mutage réalisé à 73 kJ/l (40°C) entraîne une perte de 1,21 Log UFC/ml qui, dans notre essai, semble suffisant pour réaliser le mutage du vin sans utilisation de SO₂. L'application d'une énergie de 107 kJ/l (50°C) permet une diminution de la population levurienne de 3,76 Log UFC/ml, ce qui stoppe de façon certaine la fermentation alcoolique.

A iso-énergie exprimé en kJ/l, le débit de traitement n'a aucune influence sur l'efficacité du mutage des vins par des CEP.

Figure N°9 : Mutage d'un vin de Sauvignon Blanc par des Champs Electriques Pulsés - Comparaison de 2 niveaux d'énergie et de 2 débits de travail - Fréquence des impulsions 1000 Hz

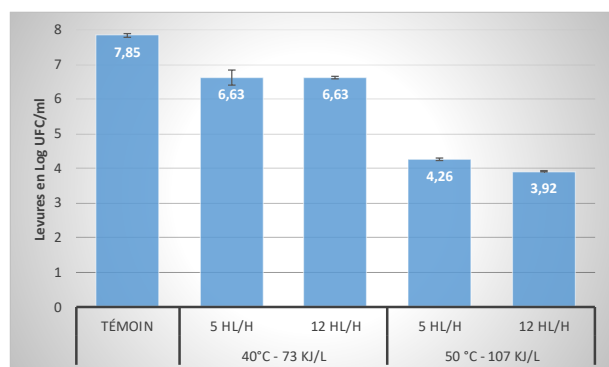
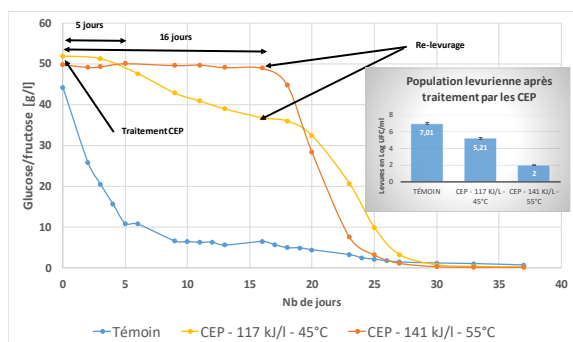


Figure N°10 : Mutage d'un vin de Sauvignon Blanc par des Champs Electriques Pulsés – Suivi de la reprise de fermentation en étuve à 25°C – Comparaison de 2 niveaux d'énergie – Fréquence des impulsions 500 Hz



Les fermentations alcooliques sont stoppées net immédiatement après traitement du vin par les CEP (aucun ajout de SO₂). Après traitement, les vins sont placés dans une étuve à 25°C afin de voir la vitesse de reprise de la fermentation alcoolique. Pour le vin Témoin, la fermentation se poursuit rapidement jusqu'à 8 g/l de sucre, puis devient languissante et la dégradation complète des sucres est achevée après 30 jours. Sur le vin traité à 117 kJ/l (45°C), on observe une reprise de la fermentation après une phase de latence de 5 jours. La fermentation est alors assez lente. Avec un traitement à 141 kJ/l (55°C), la fermentation n'a toujours pas repris après 16 jours à 25°C. Après levurage, la fermentation s'achève très rapidement pour les deux modalités traitées par des CEP.

3.2 Destruction des levures de type Brettanomyces

Le test 1 est réalisé sur un moût ensemencé avec une souche de Brettanomyces BR22 issue de la collection de l'IFV de Beaune. Une phase de multiplication et de réacclimatation (1 mois) a été nécessaire avant ensemencement de la cuve à contaminer. Après contamination de la cuve, par les levures réacclimatées, les levures se sont multipliées durant 1 mois. Les Test 2 et 3 sont réalisés sur 2 vins différents de Malbec prélevés dans une cave. Pour le Test 3, deux configurations de chambres de traitement ont été évaluées : 4 chambres de traitements montées en série ou 2 groupes de chambres avec un

refroidissement intermédiaire (cf figure N°6). L'objectif de cette configuration est d'augmenter l'énergie reçue par le vin tout en limitant l'échauffement du vin et la consommation énergétique.

Figure N°11 : Tests de stabilisation microbienne des vins vis-à-vis des levures de type Brettanomyces

Test 1	Température en °C	Energie en kJ/l	Brettanomyces en UFC/50 ml
Control			8150 / ml
500Hz - 5hl/h - 4 chambres en série	60°C	156	< 1
1000Hz - 5hl/h - 4 chambres en série	60°C	156	< 1
500Hz - 11hl/h - 4 chambres en série	60°C	156	< 1
1000Hz - 11hl/h - 4 chambres en série	60°C	156	< 1

Test 2	Température en °C	Energie en kJ/l	Brettanomyces en UFC/100 ml
Témoin			24 050/ml
500Hz - 5hl/h - 4 chambres en série	47°C	105	54
1000Hz - 5hl/h - 4 chambres en série	47°C	105	< 1
500Hz - 11hl/h - 4 chambres en série	47°C	105	< 1
1000Hz - 11hl/h - 4 chambres en série	45°C	97	< 1

Test 3 - 5hl/h	Température en °C	Energie en kJ/l	Brettanomyces en UFC/ml
Témoin			99
500 Hz - 4 chambres en série	65°C	180	< 1
1000 Hz - 4 chambres en série	63°C	165	< 1
1000 Hz - 2 chambres + 2 Chambres *	33°C + 33°C	184	< 1
1000 Hz - 2 chambres + 2 Chambres *	38°C + 38°C	222	< 1
500 Hz - 2 chambres + 2 Chambres *	35°C + 35°C	198	< 1
500 Hz - 2 chambres + 2 Chambres *	37°C + 37°C	210	< 1

* : Refroidissement entre chaque groupe de 2 chambres

Sur l'ensemble des vins utilisés pour nos essais, le traitement par des CEP permet d'éliminer la quasi-totalité (< 1/ml) des populations de Brettanomyces. Même avec un faible niveau d'énergie (105 kJ/l, 47°C) mis en œuvre pour le traitement CEP, les populations sont à des niveaux quasi indétectables (< 1/100 ml), excepté pour 1 modalité où l'on retrouve 54 cellules/100 ml. Comme pour les levures de type Saccharomyces Cerevisiae, à iso-énergie, il n'y a aucun effet du débit sur l'efficacité du traitement. Le traitement du vin en utilisant 2 groupes de 2 chambres avec refroidissement intermédiaire, a permis un apport d'énergie important tout en limitant fortement l'élévation de température (< 40°C). Pour la modalité avec un apport de 222 kJ/l, le traitement avec les 4 chambres montées en série, aurait conduit à une élévation de la température du vin jusqu'à 76°C contre 2x38°C maximum avec notre configuration.

3.3 Destruction des bactéries lactiques

Cet essai est réalisé sur une cuve en cours de fermentation malolactique et n'a fait l'objet d'aucun ensemencement en bactéries lactiques. Ce cas de figure n'est pas représentatif d'une utilisation industrielle, mais est utilisé comme modèle pour réaliser un traitement avec une population élevée en bactéries lactiques.

Un faible niveau d'énergie (63 kJ/l – 40°C) est inefficace pour détruire les bactéries lactiques. Pour obtenir une destruction significative des bactéries lactiques, il faut apporter un minimum de 141 kJ/l et l'élimination complète est obtenue avec 197 kJ/l. soit un niveau proche de la flash pasteurisation (avec la durée du chambrage en moins). Après traitement les vins sont mis dans une salle régulée à 20°C pour suivre la vitesse de reprise de la FML.

Figure N°12 : Tests de stabilisation microbienne des vins vis-à-vis des bactéries lactiques - Comparaison de 2 fréquences de travail et différents niveaux d'énergie – débit de travail 5hl/h

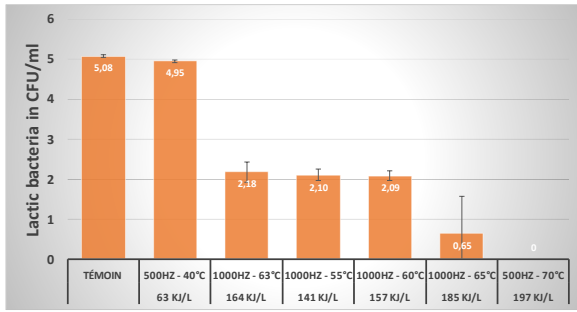
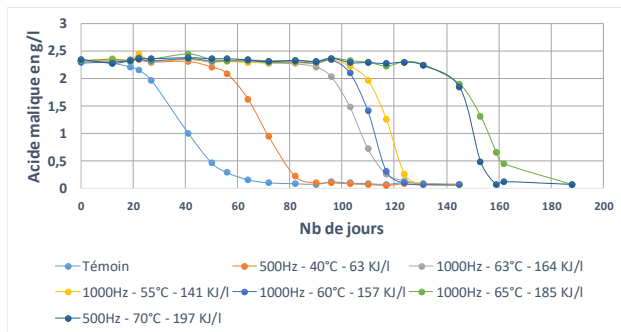


Figure N°13 : Tests de stabilisation microbienne des vins vis-à-vis des bactéries lactiques – Recolonisation en bactéries lactiques par le suivi de la dégradation de l'acide malique



Le Témoïn achève sa fermentation malolactique environ 70 jours après la date de traitement. Le lot traité avec 63 kJ/l présente un décalage de 20 jours par rapport au Témoïn pour que la fermentation malolactique (FML) reparte. Le décalage de reprise de la FML est d'autant plus important que l'énergie mise en œuvre par le traitement est importante. Pour une énergie de 141 à 164 kJ/l, la FML est retardée de 90 à 100 jours et peut atteindre 150 jours pour des niveaux d'énergie de 185 kJ/l minimum. Une fois le milieu recolonisé par les bactéries lactiques, la dégradation de l'acide malique est très rapide. 190 jours après le traitement, l'ensemble des vins a achevé sa FML.

4. Conclusions

Ces premiers tests de désactivation microbienne des vins par utilisation de champs électriques pulsés en conditions semi-industrielles (4 à 12 hl/h) sont très encourageants. Le mutage des vins par utilisation de CEP a permis un arrêt instantané de la fermentation alcoolique après passage dans les chambres de traitement sans utilisation de SO₂. La réduction des populations levuriennes est comprise entre -2 et -4 Log en fonction des caractéristiques du traitement. Ces résultats sont obtenus avec une faible élévation de température du vin (40°C à 50°C) et sans chambrage. La flash pasteurisation nécessite une température de 76°C pour le mutage d'un vin doux avec un chambrage de 20 à 30 secondes. L'élimination des levures de contamination de type *Brettanomyces/Dekkera*, sur des vins contaminés naturellement, a permis dans tous les cas de réduire les populations à des concentrations <1 CFU/100 ml. La destruction des bactéries lactiques par l'utilisation de CEP est également efficace, mais ces premiers résultats montrent qu'il est nécessaire d'apporter un niveau d'énergie plus élevé que pour les levures pour obtenir la destruction totale des bactéries lactiques du vin.

Les 1^{er} essais d'optimisation du traitement, en répartissant les 4 chambres de traitement en 2 groupes de 2 chambres avec un refroidissement intermédiaire, semblent prometteurs pour augmenter la quantité d'énergie apportée lors du traitement, tout en limitant l'élévation de température, et en optimisant la consommation énergétique. Cela pourrait être particulièrement intéressant pour la destruction des bactéries lactiques qui sont plus difficiles à éliminer.

Des essais complémentaires sont en cours afin d'évaluer plus précisément l'impact de cette technologie sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. Des essais sont également prévus pour assurer la stabilisation microbiologique des vins lors de la mise en bouteilles. Une comparaison de la flash pasteurisation avec la technologie des Champs Electriques Pulsés sera mise en place afin d'évaluer leur efficacité respective, mais aussi l'impact sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins.

Références

- [1] E. Puértolas, N. López, G. Saldaña, L. Álvarez, J. Raso, J. Food Eng. **98**, 120-125 (2010) doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.12.017
- [2] C. Delsart, Thèse de doctorat, ISV Bordeaux (2012)
- [3] E. Puertolas, G. Saldana, S. Condon, L. Alvarez, J. Raso, J Food Sci **74**(C),647-52 (2009) doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01343.x.
- [4] H.N. Rajha, Thèse de doctorat Université Technologique de Compiègne, Université Sainte Joseph de Beyrouth (2015)
- [5] F. Davaux, J.-B. Leroy, L. Royant and S. Marchand, Increased diffusion kinetics of red and white grape skin compounds by pulsed electric fields, *BIO Web Conf.*, 12 (2019) 02008, DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191202008>
- [6] T. Garde-Cerdán, A.R. Marsellés-Fontanet, M. Arias-Gil, C. Ancín-Azpilicueta, O. Martín-Belloso, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **9**, 469-476 (2008) doi:10.1016/j.ifset.2008.05.002.
- [7] A.R. Marsellés-Fontanet, A. Puig, P. Olmos, S. Mínguez-Sanz, O. Martín-Belloso, *Int. J. Food Microbiol.* **130**, 159-165 (2009) doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.034
- [8] J. Mattar, M.F. Turk, A. Maurice Nonus, N. I. Lebovka, E.V. Henri El Zakhemb, *Bioelectrochemistry* **103**, 92-97 (2014) doi:10.1016/j.bioelechem.2014.08.016
- [9] N. López, E. Puértolas, S. Condón, I. Álvarez, J. Raso *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **9**, 477-482 (2008) doi:10.1016/j.ifset.2007.11.001
- [10] N.E. Darra, M.A. Ducasse, M.F.Turk, N. Grimi, R.Maroun, N. Louka, R. Guérin-Schneider, E. Vorobiev E. *Macrowine*, Bordeaux (2012)
- [11] J. Raso-Pueyo, V. Heinz *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (Springer 2006)
- [12] R.I. Putrit, I.N. Syamsiana, L.C. Hawa, *Int. J. Comp. Elec. Eng.* **2**, 916-923 (2010)
- [13] Q. Zhang, G.V. Barbosa-Cánovas, B.G. Swanson, *J. Food Eng.* **25**, 261-281 (1995)
- [14] L. Zheng-Ying, W. Yan, W. *Symp. High Voltage Eng.* Yokohoma, Japan, Aug, 23-27 (1993)
- [15] S.R. Sarathy, C. Sheculski, J. Robinson, J. Walton, A. Soleymani, M.A. Kempkes, M.P.J. Gaudreau, D. Santoro, *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies, IFMBE Proceedings* (2016)
- [16] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, *Biophys. J.* **14**, 881-899 (1974)
- [17] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Beckers, F. Riemann, *Bioelectrochem.Bioenerg.* **3**, 58-83 (1976)

Web of Conferences

- [18] U. Zimmermann, Rev. Phys. Biochem. Pharmacol. **105**, 176-256 (1986)
- [19] R. Timmermans, Thèse de doctorat, Université de Wageningen (2018)
- [20] H. Hülshager, J. Potel, E.G. Niemann, Radiation and Environmental Biophysics, **22**, 149-162 (1983)
- [21] K. Aronsson, M. Lindgren, M. Johansson, B.R. Rönner, Innovative Food Science and Emerging Technologie, **2**, 41-54 (2001)
- [22] K. Aronsson, B.R. Rönner, Innovative Food Science and Emerging Technologie, **2**, 105-112 (2001)
- [23] E. Vorobiev, N. Lebovka, Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials (2008), doi:10.1007/978-0-387-79374-0-8