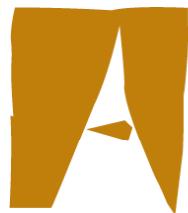


**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**Cambios en las características de un
queso de leche de cabra sometido a alta
presión hidrostática. Aceleración de la
maduración**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

Jordi Saldo Periago
Cerdanyola del Vallès, 2002



Universitat
Autònoma
de Barcelona

CER Planta de Tecnología dels Aliments



Membre de:



XARXA DE CENTRES
DE SUPORT
A LA INNOVACIÓ
TECNOLÒGICA

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

Cambios en las características de un queso de leche de cabra sometido a alta presión hidrostática. Aceleración de la maduración

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Jordi Saldo Periago
Cerdanyola del Vallès, 2002

BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, CATEDRÁTICO DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA, Y ESTHER SENDRA NADAL, PROFESORA AYUDANTE DE TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ,

HACEN CONSTAR: Que el licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Jordi Saldo Periago ha realizado, bajo su dirección, en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado "Cambios en las características de un queso de leche de cabra sometido a alta presión hidrostática. Aceleración de la maduración" que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), el 6 de Julio de 2002.

Buenaventura Guamis López

Esther Sendra Nadal

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair a la meva dona Maite el haver-me fet costat durant tot el trànsit de convertir-me en un investigador. I al meu fill Guillem que ha anat creixent al mateix temps que aquest treball.

Vull fer esment en aquest moment als meus pares, que s'omplen d'orgull en veure tots els seus tres fills.

El meu més gran reconeixement a la Esther Sendra per haver mostrat la seva confiança en mi des d'un bon començament. Pel gran esforç d'haver estat pendent del meu treball des de la UMH. I pel que s'ha anat convertint en una bona amistat.

A en Ventura Guamis vull donar-li les gràcies per haver-me permès treballar en el seu grup, un dels que excel·leixen dins la UAB, en una línia de treball que es troba a la avantguarda de la tecnologia d'aliments.

Els meus agraïments van també per als meus companys al CER PTA, amb els que he compartit la feina al laboratori, a la planta pilot, els viatges a Muntanyola, i moltes tertúlies. Vull destacar a en Martín Buffa, amb qui ens hem anat fent de llebre durant la cursa per acabar les nostres tesis. A en Joan Miquel, que amb la seva laboriositat i la seva constant disponibilitat fa més fàcil la feina dels altres. A la Marta, pel seu model de laboriositat discreta i constant. A la Montse i a la Reyes, per haver-me acollit cada una al seu moment dins dels seus despatxos. A en Ramón per la seva bonhomia. A en Toni per fer-me reflexionar davant la seva puntual crítica. I als tècnics del laboratori i la planta pilot, la Pilar, la Teresa i en Angel. I vull saludar a tots els companys, els noms dels quals no surten aquí però que tenen el seu lloc al meu cor, i que han mirat aquesta plana primer de tot per veure si es trobaven.

Als col·legues d'altres centres de recerca amb qui he pogut fer treballs de forma compartida. La Sònia Novella de la UB, la Veli Fernández a Karlsruhe, en Alan Kelly i en Paul McSweeney a Cork. Especialment als dos darrers que em van acollir en els seus laboratoris.

Vull agrair a en Narcís Grevol el haver-me permès accedir al equip d'alta pressió d'Espuña. I a la gent de la Formatgeria del Montseny per haver-me cedit mostres.

Vull recordar les persones que han fet les seves pràctiques en alguns aspectes d'aquest treball. La Susanna Cunquero, la Sònia Llorens, la Carme Ros, l'Anna Verdaguer, la Rosa Bardia i en Ferran Pratginestòs.

RESUMEN

La maduración es una de las partes del proceso de elaboración del queso en que pueden realizarse importantes acciones para reducir los costes de producción en la industria quesera. Es un proceso largo que implica mantener unos importantes inmovilizados, invertir en cámaras de maduración capaces de mantener grandes volúmenes, afrontar los costes de refrigeración y el riesgo de aparición de defectos durante el madurado. Las ventajas económicas que aportaría su control son evidentes.

La tecnología de tratamiento de alimentos mediante alta presión isostática es una de las más prometedoras de entre las llamadas tecnologías emergentes. La mayoría de desarrollos de aplicaciones existentes se han orientado hacia la conservación de alimentos, pero el potencial para transformar productos no es menos importante.

Un tratamiento prolongado del queso a 50 MPa causa una aceleración de la proteolisis durante el tiempo de mantenimiento de la presión, volviendo al ritmo normal cuando se libera la presión. La efectividad de este tratamiento es mayor cuanto menor es el tiempo de maduración previo al tratamiento por alta presión. Un tratamiento corto e intenso (400 MPa durante 5 min) produce un incremento permanente en el ritmo de proteolisis.

La intensidad del tratamiento de 400 MPa causa una inactivación parcial del cuajo residual, interfiriendo en la proteolisis primaria. La hidrolisis de la α_5 -caseina es menor a causa de esta inactivación. El resultado es una mayor proporción de péptidos hidrófobos.

El tratamiento de 400 MPa reduce en unos 3 órdenes de magnitud los recuentos de bacterias lácticas correspondientes al fermento. El aumento de la actividad peptidolítica en estos quesos se debió a un aumento en la actividad de las peptidasas provenientes del citoplasma de las bacterias lácticas tras su lisis o gracias a la mayor permeabilidad de la membrana favorecida por la presión.

La aceleración de la proteolisis se ve favorecida por el mayor pH y mayor actividad de agua de los quesos tratados por alta presión.

Al tratar el queso mediante alta presión se provoca un cambio en su microestructura que tiene reflejo en los cambios de textura, y en menor medida de color, que se producen. Los quesos se convierten en menos quebradizos y su color es menos luminoso y más intenso (con un mayor valor de Chroma). La microestructura se convierte en más compacta, con una red proteica más regular y continua.

RESUM

La maduració és una de les parts del procés d'elaboració del formatge on poden realitzar-se importants accions per a reduir els costos de producció en la indústria formatgera. És un procés llarg que implica mantenir uns importants immovilitzats, invertir en cambres de maduració capaces de mantenir grans volums, afrontar els costos de refrigeració i el risc d'aparició de defectes durant el madurat. Els avantatges econòmics que aportaria el seu control són evidents.

La tecnologia de tractament d'aliments mitjançant alta pressió isostàtica és una de les més prometedores d'entre les anomenades tecnologies emergents. La majoria de desenvolupaments d'aplicacions existents s'han orientat cap a la conservació d'aliments, però el potencial per a transformar productes no és menys important.

Un tractament perllongat del formatge a 50 MPa causa una acceleració de la proteolisi durant el temps de manteniment de la pressió, tornant al ritme normal quan s'allibera la pressió. L'efectivitat d'aquest tractament és major com menor és el temps de maduració previ al tractament per alta pressió.

Un tractament curt i intens (400 MPa durant 5 min) produeix un increment permanent en el ritme de proteolisi. La intensitat del tractament de 400 MPa causa una inactivació parcial del quall residual, interferint en la proteolisi primària. L'hidrolisi de la α_s -caseïna és menor a causa d'aquesta inactivació. El resultat és una major proporció de pèptids hidròfobs.

El tractament de 400 MPa redueix en uns 3 ordres de magnitud els recomptes de bacteris làctics corresponents al ferment. L'augment de l'activitat peptidolítica en aquests formatges va ser causada per un augment en l'activitat de les peptidases provinents del citoplasma dels bacteris làctics després de la seva lisi o mercès a la major permeabilitat de la membrana afavorida per la pressió.

L'acceleració de la proteolisi es veu afavorida pel major pH i la major activitat d'aigua dels formatges tractats per alta pressió.

En tractar el formatge mitjançant alta pressió es provoca un canvi en la seva microestructura que té reflex en els canvis de textura, i en menor mesura de color, que es produeixen. Els formatges es converteixen en menys trencadissos i el seu color en menys lluminós i més intens (amb un major valor de Chroma). La microestructura es converteix en més compacta, amb una xarxa proteica més regular i contínua.

SUMMARY

The ripening is one of the parts of the manufacture process of cheese in that is possible to carry out important actions to reduce the production costs in the cheese industry. It is a long process that implies support important immobilized, invest in ripening chambers able to hold large volumes, face the refrigeration costs and the defect appearance risk during the ripening. The economic advantages of ripening control are evident.

The food treatment technology by means of high isostatic pressure is one of the more promising of between the so called emergent technologies. The existing application developments are mostly focused on food preservation, but the potential to transform foodstuff is not less important.

A prolonged cheese treatment at 50 MPa causes an acceleration of proteolysis during the maintenance time of pressure, turning to the normal rate when pressure is released. The effectiveness of this treatment is higher as the ripening time previous to the high pressure treatment is shorter. A short and intense treatment (400 MPa for 5 min) produces a permanent increment in the proteolysis rate.

The intensity of the treatment at 400 MPa causes a partial inactivation of the residual curd, interfering in the primary proteolysis. The α_s -casein hydrolysis is smaller because of this inactivation. The result is a higher proportion of hydrophobic peptides.

The treatment at 400 MPa reduces in 3 magnitude orders the lactic bacteria counts corresponding to the starter. The increase on peptidolytic activity in these cheeses is due to an increase in the activity of peptidases coming from of lactic acid bacteria cytoplasm after their lysis or released through the pressure favoured membrane permeability.

Proteolysis acceleration is favoured by the higher pH and water activity values on high pressure treated cheeses.

The cheese treatment by means of high pressure provokes a change in its microstructure that has been reflected in the texture changes, and in lesser extent on colour changes, that they are produced. The cheeses are converted into less crumbly and its colour becomes less luminous and more intense (with a higher Chroma value). The microstructure himself becomes more compact, with a more even and regular protein network.

ÍNDICE

1	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	1
1.1	Estructura de la tesis	1
2	INTRODUCCIÓN.....	3
2.1	El queso.....	3
2.1.1	El queso tipo Garrotxa.....	4
2.2	Glicolisis.....	4
2.3	Lipolisis.....	5
2.4	Proteolisis.....	6
2.4.1	Agentes proteolíticos.....	7
2.5	Maduración acelerada de queso	8
2.5.1	Elevación de la temperatura	9
2.5.2	Adición de enzimas	9
2.5.3	Pastas de queso (“Cheese slurries”)	10
2.5.4	Adición de adjuntos.....	10
2.5.5	Adición de aminoácidos	10
2.5.6	Selección/modificación de cultivos iniciadores	10
2.6	Alta presión hidrostática. (Efectos de la alta presión en los componentes de los alimentos, con especial atención a los productos lácteos)	11
2.6.1	Agua	12
2.6.2	Grasas.....	12
2.6.3	Proteínas.....	13
2.6.4	Efectos en las enzimas.....	15
2.6.5	Efectos en los microorganismos.....	17
2.6.6	Influencia del pH, actividad de agua y temperatura	20
2.7	Tecnología y equipos.....	21
2.7.1	Principales áreas de aplicación.....	24
2.8	Bibliografía	27
3	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	37
3.1	Evaluación de un método para acelerar la maduración de queso de cabra mediante alta presión hidrostática (1999) J. Saldo, E. Sendra, B. Guamis. <i>Alimentaria</i> 99 (308) 75-78	37
3.2	High hydrostatic pressure for accelerating ripening of goat's milk cheese: proteolysis and texture (2000) J. Saldo, E. Sendra, B. Guamis. <i>Journal of Food Science</i> 65 (4) 636-640	45

3.3 Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. (2001) J. Saldo, E. Sendra, B. Guamis. <i>Lait</i> 81 (5) 625-635.....	53
3.4 Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening (2002) J. Saldo, P.L.H. McSweeney, E. Sendra, A.L. Kelly, B. Guamis. <i>International Dairy Journal</i> 12 (1) 35-44.....	67
3.5 Colour changes during ripening of high pressure treated hard caprine cheese (2002) J. Saldo, E. Sendra, B. Guamis. <i>High Pressure Research</i> 22 (3-4) 659-663	79
3.6 Changes in water binding in high-pressure treated cheese, measured by TGA (Thermo-gravimetical analysis) (2002) J. Saldo, E. Sendra, B. Guamis. <i>Innovative Food Science and Emerging Technologies (en prensa)</i>	87
3.7 Analysis of the volatile fraction of high pressure treated caprine cheese by simultaneous distillation-extraction and gas chromatography (2002) J. Saldo, A. Fernández, E. Sendra, P. Butz, B. Tauscher, B. Guamis. <i>European Food Research and Technology (enviado)</i>	95
4 DISCUSIÓN GENERAL	109
4.1 Composición General. Efecto sobre el agua.....	109
4.2 Proteolisis.....	110
4.3 Lipolisis	112
4.4 Glicolisis	113
4.5 Microbiología.....	115
4.6 Textura y microestructura	117
4.7 Color.....	120
4.8 Bibliografía	121
5 CONCLUSIONES	123

1 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La intención del presente estudio ha sido investigar el potencial de los tratamientos de alta presión para acelerar la maduración del queso. Dado que los efectos de la presión son múltiples, se consideró necesario no limitar el estudio a los efectos directos sobre los indicadores de maduración acelerada. Algunos de los efectos del tratamiento podrían resultar beneficiosos, mientras que otros podrían resultar contraproducentes.

Se escogió el queso Garrotxa como modelo de queso dentro del proyecto FAIR-CT96-1113. El grupo de trabajo del CER Planta de Tecnología dels Aliments fue el encargado de estudiar los efectos de los tratamientos de alta presión en leche de pequeños rumiantes. El queso Garrotxa, el queso de cabra más consumido en Catalunya, fue el escogido para el estudio.

Otros trabajos se realizaron de forma coordinada dentro del mismo proyecto. El grupo del National Dairy Products Research Centre en Fermoy, Irlanda, estudió el efecto de la presión en la maduración de queso Cheddar. El grupo de la Universidad de Gent, Bélgica, estudió el efecto de la presión sobre queso Gouda.

1.1 ESTRUCTURA DE LA TESIS

El siguiente capítulo incluye una revisión bibliográfica de los fenómenos de maduración del queso y de las técnicas de maduración acelerada. También una revisión de la tecnología de alta presión hidrostática, sus efectos sobre los componentes del queso y la tecnología disponible hasta el momento.

En el capítulo tercero se incluyen las publicaciones que componen el *corpus* de esta tesis. La primera de ellas corresponde a los estudios preliminares. Dentro del planteamiento inicial del proyecto FAIR-CT96-1113 se incluyó el estudio de la maduración acelerada de queso tal como se encuentra descrita en el trabajo de Yokoyama (1992). En este trabajo se desarrolló una patente que propone tratar un queso Cheddar joven, al que se adiciona un gran nivel de un cultivo de *Lactobacillus*, reclamando obtener tras 72 horas de tratamiento a 50 MPa y 25 °C un producto equivalente a un queso de 3 meses. En nuestro estudio se comprobaron los efectos del tratamiento prolongado bajo presión sobre queso Garrotxa.

Como consecuencia de los pobres resultados de aumento de la proteolisis obtenidos por el tratamiento original de 50 MPa durante 72 horas se desarrollaron otras estrategias de tratamiento. En la segunda publicación incluida se muestra la evolución de los índices de proteolisis y las características de textura durante la maduración siguiente a los tratamientos de alta presión. En este trabajo se compararon los efectos de dos tratamientos (400 MPa durante 5 min y 50 MPa durante 72 horas) y su combinación, como sistemas de aceleración de la maduración del queso.

Los importantes efectos sobre la textura y estructura del queso del tratamiento de alta presión se encuentran en el tercero de los artículos incluidos.

La proteólisis, como principal fenómeno en la maduración del queso, fue estudiada en detalle en el cuarto artículo incluido. Se siguieron los perfiles de caseínas y sus productos de degradación mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida, así como los perfiles de aminoácidos libres. Los resultados obtenidos se estudiaron mediante análisis multivariantes. También se estudió el efecto del tratamiento del queso por alta presión en la actividad de las enzimas proteolíticas (cuajo residual y plasmina).

No solamente se observaron cambios en la composición química del queso Junto con los cambios en la estructura provocados por el tratamiento estudiado en el capítulo 3.3, también se estudió la evolución del color de los quesos, como consecuencia de los tratamientos de alta presión y durante la posterior maduración de los mismos en el artículo que compone el capítulo 3.5.

El tratamiento de alta presión se comprobó que causaba cambios en el contenido de humedad de los quesos durante su maduración. Estos cambios se estudiaron en detalle, siguiendo la evolución de las fracciones libre y ligada del agua. Este estudio se encuentra en el capítulo 3.6.

El estudio de la fracción volátil sirvió para rastrear la posible presencia de compuestos no propios de este tipo de queso formados como consecuencia del tratamiento de presión. También sirvió para comprobar el correcto funcionamiento de los procesos bioquímicos del queso durante la maduración. Los resultados de este estudio se presentan en el capítulo 3.7.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 EL QUESO

El queso en su origen fue una forma de conservar los principales nutrientes de la leche (proteínas y lípidos). Se evita el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes mediante una combinación de acidificación, deshidratación, bajo potencial redox y salado. Pero en la mayoría de las variedades de queso la actividad de agua que se mantiene durante su maduración permite una serie de cambios microbiológicos y enzimáticos que contribuyen a la maduración durante su almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura controladas. Las características de cada tipo de queso son debidas al proceso de elaboración y al origen de la leche utilizada en su elaboración (vaca, oveja o cabra) y se desarrollan durante la maduración mediante cambios bioquímicos que se encuentran determinados por la composición de la cuajada, microbiota existente y actividad residual de las enzimas nativas de la leche y del cuajo.

Factores en la producción que originan distintos estilos de queso			
Origen de la leche	Cuajada	Temperatura de cocción cuajada	Microbiota acompañante
<ul style="list-style-type: none"> • Vaca • Oveja • Cabra • Otros (Yak, yegua, camella, ...) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácida <ul style="list-style-type: none"> ○ Acción de microorganismos (inóculos o microbiota nativa) ○ Ajuste directo de pH (glucono-Δ-lactona, ácidos orgánicos) • Enzimática <ul style="list-style-type: none"> ○ Cuajo animal ○ Cuajo microbiano ○ Quimosina recombinante ○ Cuajo vegetal • Mixta 	<ul style="list-style-type: none"> • Pasta cruda • Pasta cocida 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias lácticas <ul style="list-style-type: none"> ○ Homo- o hetero-fermentativas ○ Mesófilas o termófilas ○ Adjuntos no iniciadores • Levaduras superficiales • Mohos superficiales • Bacterias superficiales • Mohos interiores

La maduración del queso implica cambios en las propiedades de la cuajada, acompañados por el desarrollo de sus características típicas. La glicolisis, lipolisis y proteolisis son reacciones primarias de hidrólisis de los principales componentes de la leche: lactosa, triglicéridos y proteínas, y son en gran parte responsables de los cambios de textura y del sabor básico del queso.

Posteriormente ocurren numerosas transformaciones de los productos finales de estas reacciones primarias hasta compuestos directamente implicados en el desarrollo del aroma y sabor típico del mismo (Fox y Law, 1991).

2.1.1 *El queso tipo Garrotxa*

El queso Garrotxa o de “pell florida” es producido en diversas instalaciones distribuidas por toda Catalunya (no únicamente en la comarca que le da nombre) a partir de leche de cabra pasteurizada. No existe ninguna reglamentación específica que acoja estos quesos, y por tanto las prácticas de elaboración no están totalmente estandarizadas (especialmente por lo que respecta a las condiciones de pasteurización y las características del cuajo añadido).

Corresponde a la recuperación de un queso tradicional que se había extinguido. Se encargó a Enric Canut y a Ramon Badia la tarea de recuperar y tipificar las pautas tradicionales de elaboración y maduración. Se escogió un formato comercial similar al que se obtenía con las antiguas queseras o moldes de barro. Las condiciones ambientales de Sant Miquel de Campmajor, en la comarca de Garrotxa, favorecían el desarrollo espontáneo de un hongo azulado, de crecimiento superficial que se identificó como *Penicillium glaucum*. Se decidió respetar esta característica y se definieron pautas de elaboración que incorporasen en el proceso de producción de las calidades deseadas de forma reproducible.

De acuerdo con la descripción de Canut (2000) el queso obtenido presenta exteriormente una corteza aterciopelada de color gris azulado a causa del crecimiento fúngico. El interior es compacto, con algunas pequeñas cavidades mecánicas, de un color blanco intenso. Su textura es blanda y ligeramente untuosa. Tiene un sabor suave y muy agradable, ligeramente ácido, muy mantecoso, incluso fundente en el paladar, y con un regusto a avellanas.

Pratginestòs y Romero (1998) censaron 10 queserías que elaboraban este tipo de queso, todas ellas establecidas entre 1980 y 1988, coincidiendo con el auge del neo-ruralismo. La producción fue de unas 87 toneladas el año 1998, con un volumen de negocio de 729 000 €/año.

2.2 GLICOLISIS

De la lactosa presente en la leche una parte importante se elimina durante el drenaje del suero de quesería. Pero la parte remanente resulta fermentada, principalmente a ácido L-láctico, hasta alcanzar un pH de aproximadamente 5,2. El ácido láctico producido es metabolizado hasta CO_2 y H_2O , además de una serie de ácidos de cadena corta, o sus correspondientes sales, dependiendo de la microbiota y tecnología de elaboración de cada variedad de queso.

La transformación de la lactosa en ácido láctico por las bacterias del cultivo iniciador ocurre fundamentalmente en la cuba de fermentación y durante el prensado posterior y oreo. El descenso del pH alcanza valores próximos a 5,4-5,5 dependiendo del tipo de queso. La mayor parte de la lactosa que no ha sido

transformada se pierde en el desuero, pero la cuajada aún puede retener un 0,7-1,5 % de lactosa residual (Fox, Wallace, Morgan, Lynch, Niland y Tobin, 1996). Esta lactosa sigue siendo metabolizada por las bacterias del cultivo, pero en ocasiones también puede utilizarse por bacterias heterofermentativas indeseadas, lo que da lugar a la aparición de defectos como agrietamiento u ojos no deseados en el queso.

El ácido láctico producido en la fermentación de la lactosa contribuye al aroma del queso, junto con otros compuestos como ácidos volátiles, aldehídos y alcoholes. Parte del ácido láctico reacciona con radicales básicos presentes en el queso formando sales y en ciertas variedades (p.ej. Emmental) en las que se añaden bacterias propiónicas junto al cultivo iniciador, tiene lugar una fermentación secundaria del ácido láctico con producción de ácidos propiónico y acético, así como CO₂ responsable de la formación de ojos en la pasta del queso.

Algunas bacterias lácticas como *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* metabolizan el citrato que permanece en la cuajada tras el desuero originando principalmente acetoína y diacetilo, compuestos que intervienen en el aroma de quesos y de la mantequilla (Fox, Lucey y Cogan, 1990).

2.3 LIPOLISIS

La lipolisis no es un fenómeno predominante en la maduración de la mayoría de los quesos, a excepción de los madurados por mohos y algunas variedades de quesos elaborados con pastas de cuajo. Los productos que se generan a partir de la grasa de leche son ácidos grasos libres, algunos de los cuales son volátiles y contribuyen en gran medida al aroma del queso. Además, son precursores de otros compuestos involucrados en el aroma como alcoholes, ésteres etílicos, metílicos, aldehídos y metilcetonas (McSweeney y Sousa, 2000).

Las enzimas lipolíticas del queso pueden proceder de la leche, de los microorganismos o de las preparaciones enzimáticas a partir del estomago de jóvenes rumiantes, conocidas como pastas de cuajo, que se añaden a la leche como coagulante en la elaboración de quesos italianos como el Romano y Parmesano y algunos españoles como el Majorero de Fuerteventura (Battistotti, Corradini y Fox, 1993; Prado Alderete, Arancibia, Fuentes, Zazopulos y Del Moral, 1993) y que contienen esterasa pre-gástrica que se encuentra ausente en las otras preparaciones de cuajo.

La lipasa nativa de la leche es termosensible por lo que esta enzima sólo es activa en el queso elaborado con leche cruda o sometida a bajo tratamiento térmico.

Las bacterias lácticas son débilmente lipolíticas aunque se han detectado actividades esterásicas en *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Khalid y Marth, 1990; Williams y Banks, 1997). Los enterococos, presentes en algunos quesos como consecuencia de la contaminación ambiental también presentan actividad

lipolítica (Menendez, Centeno, Rodríguez Otero y Otero, 1999b; Tzanetakis y Litopoulou Tzanetaki, 1989) aunque su actividad proteolítica es superior.

Las bacterias psicrotrofas pueden proliferar en la leche durante la refrigeración previa al procesado, y si esto sucediese serían una fuente importante de enzimas lipolíticas. Las lipasas de estos microorganismos son termorresistentes y se asocian a la superficie del glóbulo graso, quedando retenidas en la cuajada. De esta forma las lipasas de las bacterias psicrotrofas pueden seguir actuando durante la maduración del queso (Sørhaug y Stepaniak, 1997). El exceso de lipólisis puede dar lugar a sabores rancios, jabón y otros defectos.

Los micrococos ejercen su actividad lipolítica sobre los ácidos grasos de cadena larga, proporcionando mono y diglicéridos hidrolizables por las bacterias lácticas y contribuyendo así al desarrollo del aroma. Los mohos que crecen en la superficie o en el interior de ciertos tipos de quesos poseen una actividad lipolítica importante. En los quesos azules, las lipasas de *Penicillium roqueforti* hidrolizan la grasa de la leche liberando principalmente los ácidos butírico, caproico, caprílico y cáprico, así como otros ácidos grasos de cadena larga. En este tipo de quesos, el sabor y aroma se debe principalmente a la presencia de metilcetonas producidas por β -oxidación de los ácidos grasos libres (Fox *et al.*, 1996).

2.4 PROTEOLISIS

La proteólisis, proceso mediante el cual la caseína, proteína mayoritaria de la leche, se hidroliza a compuestos de menor peso molecular como péptidos y aminoácidos libres, es uno de los fenómenos más importantes que tienen lugar durante la maduración de muchos tipos de quesos, pues contribuye tanto a la textura como al aroma y sabor del producto terminado.

Los fenómenos proteolíticos pueden dividirse en proteólisis primaria y secundaria. La proteólisis primaria corresponde a la hidrólisis de caseínas, liberando péptidos de distinto tamaño. Se produce como resultado de la acción del cuajo (quimosina y pepsina), de las proteasas nativas de la leche (plasmina) y en menor medida de las proteasas de las bacterias lácticas del fermento. La proteólisis secundaria convierte estos péptidos en aminoácidos libres, y estos sirven de substrato para la producción de otras sustancias sápidas como aminas, tioles y tioésteres. Los microorganismos del queso son los principales responsables de la proteólisis secundaria, tanto bacterias lácticas como mohos y levaduras. Algunas otras bacterias pueden tener un efecto importante en algunos quesos.

La proteólisis influye en la textura debido a la rotura de la malla proteica, al incremento del pH por formación de NH_3 y a la mayor capacidad de retener agua por los grupos amino y carboxilo formados. La formación de péptidos de pequeño tamaño molecular y aminoácidos influye directamente en el sabor básico del

queso. Además, los aminoácidos son precursores de otros compuestos responsables del aroma.

En la proteolisis también se originan compuestos responsables de características organolépticas no deseadas, como péptidos amargos, cuyo nivel en determinadas ocasiones puede superar el umbral de percepción sensorial del amargor. La acción de las enzimas proteolíticas desempeña un papel especial en la formación de sabores amargos. En contra de opiniones previas, que relacionaban el sabor amargo con aminoácidos específicos o con la longitud de la cadena peptídica, Ney (1979) fue el primero en relacionar el amargor de los productos lácteos con la hidrofobicidad promedio de los péptidos. Encontró que los péptidos de 100-600 Da con una hidrofobicidad promedio de más de 1400 cal/mol daban lugar a sabores amargos. Posteriores trabajos indican que la presencia de un aminoácido básico (como la arginina) en el extremo N-terminal (Kanehisa y Okai, 1984) o la presencia de un aminoácido hidrofóbico en el extremo C-terminal aumentarían el amargor (Shigenaga, Otagiri y Kanehisa, 1984).

El grado de proteolisis varía entre los distintos tipos de queso, desde las variedades con poca proteolisis como el Mozzarella, a aquellas otras como los quesos azules madurados por mohos, donde la proteolisis es muy intensa.

2.4.1 Agentes proteolíticos

En la degradación de la caseína intervienen distintas enzimas proteolíticas, entre las que destacan:

- La quimosina, así como otros cuajos de origen animal, vegetal y microbiano, que además de participar en el proceso de coagulación por hidrólisis de la κ -caseína, son las responsables de la hidrólisis inicial de la caseína, principalmente de la α_{S1} -caseína, durante la maduración del queso.
- Las enzimas proteolíticas endógenas de la leche, constituidas mayoritariamente por la plasmina y la catepsina. El sustrato preferido de la plasmina es la β -caseína.
- Proteasas microbianas presentes en la leche cruda que proceden principalmente de las bacterias psicrotrofas. Estos microorganismos, fundamentalmente del género *Pseudomonas*, sintetizan proteasas termorresistentes que pueden dar lugar a efectos adversos durante la elaboración y maduración del queso (Sørhaug y Stepaniak, 1997). La mayoría de proteasas de psicrotrofos tienen actividad coagulante sobre la leche, son capaces de degradar κ -, α_{S1} - y β -caseinas y tienen una variable actividad en proteínas séricas no desnaturalizadas.
- Las enzimas de bacterias lácticas procedentes del cultivo iniciador. Los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y la especie *Streptococcus thermophilus*, empleados como cultivos iniciadores en la elaboración del queso, poseen un sistema proteolítico que actúa fundamentalmente hidrolizando la caseína y los

polipéptidos y péptidos originados por el cuajo a péptidos más pequeños y aminoácidos (Visser, 1993).

- Las enzimas de bacterias lácticas que no forman parte del cultivo iniciador (NSLAB, según sus iniciales en inglés), entre las que destacan los lactobacilos heterofermentativos facultativos que constituyen la población microbiana mayoritaria al final de la maduración de muchos quesos. En algunos tipos de quesos también es de destacar la presencia de enterococos, microorganismos que poseen un sistema proteolítico muy activo (Bhowmik, Riesterer, Van Boekel y Marth, 1990b).
- Otras enzimas microbianas procedentes de la microbiota secundaria y de contaminación. Los micrococos poseen un sistema proteolítico muy importante, que participa en la degradación de la α_5 - y β -caseína (Bhowmik y Marth, 1990a; Menendez, Centeno y Rodríguez Otero, 1999a). Por otra parte, las proteinasas y peptidasas de microorganismos como *Penicillium* spp., *Geotrichum candidum* y *Brevibacterium linens* juegan un papel importante en la proteolisis de quesos madurados por mohos (Gripon y Fox, 1993; Reps, 1993).

La intensidad de la proteolisis durante la maduración del queso depende de la naturaleza y concentración de las enzimas proteolíticas arriba mencionadas y de varios factores que modifican su actividad tales como pH, temperatura, concentración de sales y potencial redox.

2.5 MADURACIÓN ACELERADA DE QUESO

La maduración del queso es un proceso costoso y relativamente largo, de ahí las indudables ventajas económicas que implicaría el control de este proceso mediante la aceleración en el desarrollo de sus características organolépticas. Muchos de los estudios realizados en este sentido se han centrado sobre la proteolisis, al ser éste el proceso fundamental que ocurre en la maduración de la mayoría de los quesos.

Los cambios bioquímicos que se producen durante la maduración deben realizarse de forma acompasada para obtener un queso de la calidad requerida. A pesar de ser un objetivo muy deseado por la industria alimentaria la maduración acelerada todavía no ha conseguido resultados satisfactorios para los quesos de mesa. A veces por la perdida de armonía entre los procesos de proteolisis primaria y secundaria, otras por el elevado coste de los procesos descritos.

La proteolisis que ocurre durante la maduración del queso proporciona péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que intervienen en el sabor básico del mismo y son precursores de compuestos volátiles. Si bien es cierto que la conversión de aminoácidos en compuestos responsables del aroma es fundamental para el desarrollo de las características típicas del queso y es en definitiva su factor limitante, el aumento en la concentración de estos precursores incide indirectamente en el resultado final. Por ello, los

procedimientos basados en el aumento de proteolisis están en definitiva encaminados a acelerar la formación del aroma y sabor del queso mediante el aumento en el contenido de aminoácidos libres. La forma en que estos procedimientos afectan a las reacciones finales de formación de volátiles a partir de los aminoácidos, es un tema de investigación sobre el que existen pocos datos todavía.

Los métodos para acelerar la maduración del queso han sido motivo de atención y revisión periódica (El Soda y Pandian, 1991; Fox *et al.*, 1996; Izco, Torre y Barcina, 1999; Manning, Ridout y Price, 1984). La elevación de la temperatura de maduración, la inclusión de enzimas exógenas, la utilización de fermentos con modificaciones químicas, físicas o genéticas, y el uso de cultivos adjuntos o de homogeneizados de queso han sido tradicionalmente los métodos sometidos a estudio y ensayo. Los procedimientos descritos hasta el momento para acelerar la proteolisis del queso son revisados a continuación.

2.5.1 *Elevación de la temperatura*

El incremento de la temperatura de maduración es un método efectivo, sin dificultades técnicas, que no supone elevados costes ni barreras legales. No obstante, su aplicación, además de aumentar el riesgo de crecimiento de microorganismos alterantes, sólo es factible en ciertas variedades de queso (Folkertsma, Fox y McSweeney, 1996). Es de destacar además el hecho de que debido a su acción inespecífica puede dar lugar a la aparición de alteraciones.

2.5.2 *Adición de enzimas*

La adición de enzimas ha sido el método más estudiado para acelerar la proteolisis del queso (Ezzat, 1990; Fernández García, López Fandiño y Alonso, 1994; Fernández García, Olano, Cabezudo, Martín Alvarez y Ramos, 1993; Kosikowski y Iwasaki, 1974). Pero su aplicación no parece ser comercialmente viable al conllevar una serie de desventajas como son: barreras legales en diferentes países, falta de control sobre su actuación durante la maduración del queso, y dificultad de una distribución uniforme en la cuajada. La encapsulación de las enzimas permite solventar este último problema pero hasta la fecha la eficiencia del proceso es baja y los costes elevados (Lariviere, El Soda, Soucy, Trépanier, Paquin y Vuillemond, 1991; Picon, Gaya, Medina y Nuñez, 1995; Picon, Gaya, Medina y Nuñez, 1997; Picon, Serrano, Gaya, Medina y Nuñez, 1996).

Existen numerosos trabajos en los que se ha estudiado la adición de combinaciones de enzimas con distinta especificidad. En queso tipo Manchego la adición de FlavourAge (mezcla de proteinasas, peptidasas y lipasas de *A. oryzae*) acortó la maduración sin alterar las características sensoriales del producto (Jin, Harper y Farkas, 1996). En Manchego se han utilizado preparados enzimáticos con actividad lipolítica, con buenos resultados organolépticos (Fernández García *et al.*, 1993).

2.5.3 *Pastas de queso ("Cheese slurries")*

Este método fue desarrollado inicialmente como un método de estudiar en el laboratorio los fenómenos de maduración de una forma acelerada. Las pastas de queso son papillas con un contenido aproximado en sólidos totales del 40%, en las que se desarrolla un completo aroma y sabor después de ser incubadas a 30º - 35ºC durante 4-5 días (Thakar y Upadhyay, 1992). Estas pastas así maduradas pueden ser añadidas en el proceso de elaboración del queso tanto a la leche como a la cuajada para acelerar la maduración (Ammar El Tahra, El Shazly, Nasr, El Saadany y El Tahra, 1994). La incorporación de proteinasas, lipasas y oligoelementos a las pastas mejora su efectividad. El principal inconveniente de la utilización de las pastas de queso es el alto riesgo de contaminaciones microbianas.

Este método ha derivado en una tecnología explotada comercialmente que produce los quesos modificados enzimáticamente, que son utilizados como base para hacer productos con sabor a queso (Kilcawley, Wilkinson y Fox, 1998).

2.5.4 *Adición de adjuntos*

La adición de adjuntos, especialmente lactobacilos de elevada actividad peptidásica, para acelerar el desarrollo del aroma y sabor del queso tiene un gran interés potencial. En este sentido se ha descrito cómo el empleo de cepas seleccionadas de lactobacilos mesófilos aumenta la concentración de aminoácidos precursores del aroma, mejorando las características sensoriales del queso (McSweeney, Walsh, Fox, Cogan, Drinan y Castelo, 1994). No obstante aún son necesarios más estudios con el fin de seleccionar aquellas cepas que aporten las características óptimas deseadas.

2.5.5 *Adición de aminoácidos*

Al intervenir los aminoácidos en el sabor básico del queso y ser precursores de otros compuestos responsables del aroma, se ha abordado la aceleración de la maduración del queso mediante la adición directa de los mismos. No obstante, Wallace y Fox (1997) observaron que la adición de un contenido muy alto de aminoácidos a la cuajada de queso Cheddar no intensificaba el aroma, poniendo de relieve el importante papel que juegan las posteriores reacciones de conversión de estos aminoácidos. Por otra parte, a escala industrial esta práctica no es económicamente rentable.

2.5.6 *Selección/modificación de cultivos iniciadores*

Los métodos basados en la selección y/o modificación de microorganismos ofrecen numerosas posibilidades. Dentro del grupo de microorganismos modificados se incluye tanto a los que han sido sometidos a tratamientos físicos o químicos para alterar algunas de sus funciones celulares (atenuados) como a aquellos otros modificados genéticamente con el fin de incrementar o disminuir algunas de sus actividades enzimáticas.

El empleo de métodos físico-químicos como tratamiento con lisozima, altas presiones, choques térmicos (de frío o calor), permeabilización de membranas o pulsos eléctricos, tiene por finalidad provocar la lisis de una masa celular añadida como adjunto que no provoca problemas de sobreacidificación, al haberse reducido la capacidad acidificante como consecuencia de los tratamientos aplicados.

Dentro de los microorganismos modificados genéticamente el empleo como adjuntos de mutantes deficientes en actividad lactasa (Lac-), permite aumentar el número de células viables presentes en la matriz del queso y con ello acelerar la maduración (Rodríguez, Requena, Goudedranche, Maubois y Juarez, 1996). Se han obtenido buenos resultados en ensayos realizados a escala piloto, aunque el coste de producción de la masa celular que se requiere a escala industrial puede disminuir la rentabilidad de esta alternativa.

Actualmente la lisis celular como método de aceleración de la proteólisis y con ello de la maduración del queso, es una de las principales líneas de investigación. En este sentido, los estudios se han centrado tanto en el empleo de cepas con elevada actividad autolítica como cultivos iniciadores o adjuntos, como en el desarrollo de métodos que provoquen la lisis celular. Estos métodos han sido choques térmicos, altas presiones, tratamientos permeabilizantes de membranas y pulsos eléctricos, que ya han sido citados anteriormente. No obstante, hoy en día los estudios se dirigen a provocar la lisis celular por otros procedimientos como termoinducción (El Soda, Madkor y Tong, 1999; Meijer, Dobbelaar y Hugenholtz, 1998), inducción de fagos (Kawabata *et al.*, 1997), clonaje de genes líticos (de Ruyter, Kuipers, Meijer y de Vos, 1997) y empleo de bacteriocinas (Garde, Gaya, Medina y Nuñez, 1997; Oumer, Garde, Medina y Nuñez, 1999).

2.6 ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA. (Efectos de la alta presión en los componentes de los alimentos, con especial atención a los productos lácteos)

La presión aplicada se transmite instantáneamente a todo el volumen tratado, independientemente del tamaño, forma o composición del alimento. El trabajo de compresión durante el tratamiento de alta presión produce un incremento en la temperatura de los alimentos a causa del calentamiento adiabático. Este calentamiento es de unos 3 °C cada 100 MPa, dependiendo de la composición de los alimentos tratados. Si el alimento contiene una cantidad significativa de grasa, como podría ser la mantequilla o la crema de leche, el aumento de temperatura puede ser mayor. Los productos tratados recuperan la temperatura inicial durante la descompresión si no ha existido intercambio de calor a través de las paredes del recipiente de presión durante el mantenimiento de la presión.

La reducción de volumen causada produce una respuesta a la perturbación introducida en el sistema en la que se favorecen ciertos procesos que tienden a

compensar la reducción de volumen (principio de Le Chatelier). Existe una tendencia a favorecer las reacciones que van acompañadas de una reducción de volumen.

Cambios de volumen que acompañan a la formación de las principales interacciones en los biosistemas. (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson y Balny, 1994)

Enlaces covalentes. $\Delta V \approx -10 \text{ mL mol}^{-1}$ por la formación de nuevos enlaces covalentes, y valores de ΔV casi nulos por intercambios en enlaces covalentes.

Interacciones electrostáticas. $\Delta V \approx -10 \text{ mL mol}^{-1}$ por la hidratación de un grupo cargado, y un valor positivo de $10-20 \text{ mL mol}^{-1}$ por la formación de un enlace electrostático.

Interacciones hidrofóbicas. Un ΔV positivo de $10-20 \text{ mL mol}^{-1}$ por los grupos $-\text{CH}_2$ que entren en contacto hidrofóbico.

Superposición de anillos aromáticos. Pequeños valores negativos de ΔV .

Puentes de hidrógeno. Valores de ΔV cercanos a cero.

2.6.1 Agua

A temperatura ambiente el agua experimenta una reducción de volumen de aproximadamente un 4% cuando se encuentra a 100 MPa, llegando al 15% cuando la presión aumenta a 600 MPa. Los alimentos con gran cantidad de agua y poco gas presentan una compresibilidad similar a la del agua (Cheftel, 1995).

El producto iónico del agua aumenta al incrementarse la presión y la temperatura. Así pues, también se hace más importante la disociación de ácidos y bases débiles durante la exposición a la presión elevada.

Los cambios de fase también resultan afectados por los cambios de presión. A presiones por encima de 200 MPa no se forman cristales de hielo de tipo I, que son los que causen daños en los tejidos por su aumento de volumen. A esta presión tenemos agua líquida hasta a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura ambiente se puede forzar la formación de hielo (cristales de tipo VI) con presiones a partir de 900 MPa (Kalichevsky, Knorr y Lillford, 1995).

2.6.2 Grasas

Los principales efectos de la alta presión sobre los lípidos se encuentran en los cambios de fase. Bajo presión los lípidos tienden a cristalizar, aumentando el punto de fusión en unos $10-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por cada 100 MPa (Buchheim, Schutt y Frede, 1996; Cheftel, 1995; Dumay, Lambert, Funtenberger y Cheftel, 1996). La cristalización de lípidos bajo presión resulta en cristales más densos y estables. Yasuda y Mochizuki (1992) desarrollaron un método alternativo al temperado

tradicional de la manteca de cacao, mediante un proceso más simplificado basado en un tratamiento cíclico de alta presión.

Estudiando el efecto de tratamientos de alta presión de entre 100 y 500 MPa y entre 1 y 5 min a temperatura ambiente en crema de leche (de un contenido graso del 35% y 43%) se observó (Buchheim y El Nour, 1992) una inducción de la cristalización de la grasa, principalmente en la periferia de los glóbulos grasos observable por crio fractura y observación mediante microscopía electrónica de transmisión. Las propiedades de batido de la nata mejoraron cuando ésta fue tratada a presiones de hasta 600 MPa durante dos minutos (Eberhard, Strahm y Eyer, 1999) debido a la mejor cristalización de la grasa láctea. Cuando las condiciones de tratamiento excedieron de un óptimo se produjo una excesiva desnaturalización de las proteínas séricas, resultando en unos tiempos de batido más largos y una desestabilización de la nata batida. Por debajo de los 400 MPa no se apreciaron efectos sobre las propiedades de batido de la nata.

Los fosfolípidos de la membrana celular también cristalizan bajo presión. La pérdida de fluidez asociada causa la inactivación de ciertos microorganismos (Lindsay y McDonald, 1992)

Se ha estudiado el efecto del tratamiento de alta presión sobre los glóbulos grasos de la leche (Gervilla, Ferragut y Guamis, 2001; Kanno, Uchimura, Hagiwara, Ametani y Azuma, 1998) sin que se observe un aumento en la lipólisis. En un estudio sobre un medio modelo parecido a la grasa láctea sometida a presiones de hasta 600 MPa (Butz, Zielinski, Ludwig y Tauscher, 1999) se observó que no existía ningún efecto sobre el ácido oleico, pero la autoxidación del ácido linoleico se incrementó cuando la presión superaba los 350 MPa. Con todo, los efectos fueron reducidos y no aparecieron productos de oxidación distintos de los que se originaron mediante un tratamiento térmico. Los autores del estudio recomiendan la necesidad de realizar estudios complementarios sobre productos lácteos reales y no limitarse a modelos de alimentos.

La fase inicial de la oxidación lipídica comporta la formación de radicales, con una variación de volumen positiva (Rovere, 1995). Esta reacción se ve dificultada bajo presión. El tratamiento de carne de cerdo (Cheah y Ledward, 1996) y de pescado (Angsupanich y Ledward, 1998) provoca un incremento de la oxidación lipídica, superior a la de las muestras no tratadas o sometidas a un tratamiento térmico. Los autores que han estudiado éste fenómeno indican que la desnaturalización inducida por la presión puede liberar metales, como el hierro de la mioglobina y metabioglobina, que catalizan la oxidación lipídica.

2.6.3 Proteínas

La estructura primaria de las proteínas viene dada por la secuencia de aminoácidos, unidos entre si mediante enlaces peptídicos. Los enlaces covalentes no se ven afectados por la aplicación de alta presión, ya que su energía de enlace es muy elevada y su compresibilidad es negligible (Mozhaev *et al.*, 1994).

La energía de enlace carbono-carbono es de 83,1 kJ/mol, la de carbono-oxígeno es de 84,0 kJ/mol y la del enlace carbono-nitrógeno es de 69,7 kJ/mol (Hayakawa, Linko y Linko, 1996), muy inferior a energía de un tratamiento de alta presión (menos de 8,4 kJ/mol a 10 000 MPa (Morild, 1981)). Es por lo que no se esperan cambios en la estructura primaria de las proteínas.

El cambio de volumen específico ΔV^0 es el elemento clave para poder estudiar la desnaturalización de las proteínas. La “paradoja del volumen proteico” tal como se encuentra descrita por Prehoda *et al.* (1999) corresponde con la escasa diferencia en ΔV^0 entre el estado plegado y el desplegado, usualmente inferior a un 0,5%. Puesto que las proteínas se desnaturalizan a causa de la presión, esto implica que el volumen molar parcial de la proteína desplegada, la más dispersa, es inferior al de la proteína plegada, aunque los valores medidos por diferentes investigadores para la diferencia de volumen específico entre ambos estados es muy pequeña. Un mecanismo propuesto para explicar la desnaturalización de las proteínas en soluciones acuosas apela a la rotura de los puentes de hidrógeno entre la superficie de las proteínas globulares y el agua circundante (Hayakawa *et al.*, 1996). Se cree que el agua que envuelve a la proteína la protege de la desnaturalización a través de los puentes de hidrógeno. Presiones elevadas (>600 MPa) producen la formación de formas agregadas de agua, más densas, de forma que se desplaza el equilibrio desde los enlaces proteína-agua a enlaces agua-agua.

La cadena polipeptídica puede replegarse para proporcionar la organización tridimensional de la proteína. El establecimiento de puentes disulfuro entre restos de cisteína limita el número de estructuras proteicas posibles. Al mismo tiempo colaboran en la estabilización de la estructura mediante los enlaces cruzados dentro de la misma cadena o entre varias subunidades de la proteína. Así pues, las moléculas que tienen de 5 a 7 enlaces cruzados disulfuro por cada 100 aminoácidos son especialmente estables. La energía del enlace disulfuro es de 213,1 kJ/mol (Hayakawa *et al.*, 1996).

La cadena se pliega para minimizar su energía libre (ΔG) en lo que se conoce como estructura secundaria. La conformación resultante se encuentra relacionada con la polaridad y restricciones estereoquímicas de las cadenas laterales. Las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno que se forman comportan una reducción de volumen, y por tanto se ven favorecidas por la alta presión.

Los cambios en la estructura de las proteínas vienen dados por el cambio de volumen de desnaturalización (ΔV_d) y por la alteración de los balances de interacciones estabilizantes-desestabilizantes. Pero en general los efectos sobre las proteínas son reversibles, y únicamente raras veces vienen acompañados por agregaciones o cambios en la estructura covalente. Cuando se libera la presión las proteínas monoméricas y oligoméricas tienden a replegarse lentamente de vuelta a su estado nativo. En las proteínas plegadas mediante chaperonas en el momento de su síntesis no es de esperar la vuelta espontánea al estado nativo.

La respuesta de las proteínas a la presión varía ampliamente debido a la forma peculiar en que las interacciones hidrofóbicas reaccionan bajo presión. Hasta los 100 MPa las interacciones hidrofóbicas tienden a causar un incremento de volumen, pero más allá de este nivel de presión se asocia una reducción de volumen con reacciones hidrofóbicas y la presión tiende a estabilizar estas reacciones. Consecuentemente la hidrofobicidad de una proteína determinará en gran medida el alcance de la desnaturalización proteica a una determinada presión (Jaenicke, 1991).

Es necesario considerar algunos cambios que pueden derivarse de la disponibilidad de agua de hidratación. El agua libre tiene una mayor compresibilidad que el agua ligada a proteínas. De esta forma al aumentar la presión se favorecen las asociaciones entre proteínas, pasando agua de hidratación a la forma libre, que resulta más compresible. La forma en que agregan las moléculas de proteína hará que los grupos hidrófilos se encuentren hacia el interior de la molécula, con una mayor exposición de las partes hidrofóbicas, a causa de la menor disponibilidad de agua como solvente. Los estudios de Johnston *et al.* (1992) y de Law *et al.* (1998) sobre leche indican que las caseínas que cambian su asociación a causa de la exposición a una presión elevada mantienen una estructura distinta de la nativa después de la exposición a la alta presión. Estos cambios provocan una reorganización de las micelas de caseína, pero que puede revertir después de un calentamiento moderado (Capellas, Mor-Mur, Sendra y Guamis, 2001).

En el estudio de gelificación de proteínas globulares mediante el tratamiento de alta presión se ha descrito que la presión provoca un desenrollamiento de la proteína, más acusado cuando el tratamiento se realiza cerca del punto isoeléctrico de las proteínas. A valores de pH próximos al punto isoeléctrico la estabilidad electrostática se encuentra minimizada y las proteínas son más sensibles a la presión. En los trabajos en que ha realizado un estudio de los enlaces formados y destruidos por el tratamiento de alta presión se ha observado que la exposición de grupos tiol -SH de β -lactoglobulina promueve la formación de puentes disulfuro (Funtenberger, Dumay y Cheftel, 1995). La energía de enlace es mayor que la energía aportada por el tratamiento de alta presión, como se ha indicado con anterioridad. La formación de estos enlaces, comprometiendo la descripción teórica del fenómeno ha sido comprobada en distintos experimentos con concentrados de proteínas séricas (Fertsch, Müller y Hinrichs, 2002; Van Camp, Messens, Clement y Huyghebaert, 1997) en que la formación de puentes disulfuro intermoleculares ha sido comprobada. Probablemente la posibilidad de formación de los enlaces existía en forma potencial, pero al encontrarse los grupos tiol protegidos en el interior de las proteínas globulares no podía materializarse el enlace.

2.6.4 Efectos en las enzimas

Las enzimas son de naturaleza proteica, y como tales se verán afectadas por los mismos fenómenos que el resto de proteínas anteriormente comentadas.

Presiones superiores a 400 MPa pueden causar cambios conformacionales tales que la enzima resulte irreversiblemente inactivado (Morild, 1981).

Los cambios sobre la actividad de las enzimas pueden ser muy variados, dependiendo de las características propias de la enzima y la presión y temperatura del tratamiento. Mozhaev *et al.* (1996) utilizaron tratamientos de alta presión para aumentar la actividad catalítica y la estabilidad térmica de la quimotripsina. A 470 MPa y 20 °C la actividad fue 6,5 veces mayor que en condiciones normales (0,1 MPa y 20 °C), y a 360 MPa y 50 °C la velocidad de reacción se incrementó hasta en 30 veces respecto a la velocidad en condiciones normales. A presión ambiental la enzima se desnaturaliza a 55 °C, mientras que a una presión de 180 MPa mantiene la actividad a esta temperatura. La estabilidad térmica de la carboxipeptidasa de la arqueobacteria extremófila *Sulfolobus solfataricus* se encuentra favorecida por la presión, hasta 600 MPa (Bec, Villa, Tortora, Mozhaev, Balny y Lange, 1996).

En enzimas multiméricas se ha atribuido a la disociación de las subunidades la principal causa de los cambios de actividad provocados por la presión, considerando que la presión inhibe su actividad mientras que la actividad de las enzimas monoméricas se ve aumentada bajo presión, en cambio Morild (1981) cuestiona la validez general de ambos puntos. Respecto al cambio de actividad de las enzimas multiméricas bajo presión, no resulta posible discriminar entre la influencia directa de la presión en el proceso catalítico y su influencia a través de la disociación de las subunidades y la consecuente desactivación.

Un aumento de presión puede causar una pérdida de actividad de la enzima a causa de los cambios conformacionales inducidos, aunque la sensibilidad a la presión resulta afectada por el medio en que se encuentra la enzima. En un estudio de Heremans y Heremans (1989) encontraron perdidas de actividad de la quimotripsina entre 100 y 300 MPa, muy por debajo de las encontradas en el estudio de Mozhaev *et al.* (1994) referido anteriormente. Seyderhelm *et al.* (1996) estudiaron el efecto de la presión y la temperatura sobre diferentes enzimas en tampón fosfato, viendo como diferentes co-solutos pueden aumentar la estabilidad. Concluyeron que la estabilidad de las enzimas en los alimentos será más alta que la encontrada en estudios en sistemas modelo. En la papaína la perdida de actividad frente a la presión fue acompañada de escasos cambios conformacionales fuera del centro activo de la enzima (Gomes, Sumner y Ledward, 1997).

Kunugi y Tanaka (1997) estudiaron el aumento de actividad de las enzimas bajo presiones inferiores a 100 MPa. Rovere (1995) indicó que a presiones por debajo de 500 MPa algunas enzimas se ven activadas. Esta activación parece estar causada por una reorganización estructural de la proteína inducida por la presión. Mathews *et al.* (1940) encontraron que por encima de los 300 MPa las proteasas pierden actividad a causa de los cambios estructurales, mientras que la pepsina y la renina resultan completamente inactivadas a partir de 500-600 MPa. La plasmina se ha mostrado como una enzima muy baroestable, resistiendo presiones de hasta 700 MPa (Scollard, Beresford, Murphy y Kelly,

2000), aunque en función del medio puede resultar más sensible. La β -lactoglobulina desestabiliza la plasmina frente al efecto de la presión.

En la conservación de muchos alimentos es necesario inactivar algunas enzimas que intervienen en su deterioro. Se ha estudiado la efectividad de los tratamientos de alta presión con este fin (Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck y Weemaes, 1998). La polifenol oxidasa causa el pardeamiento enzimático de patatas, champiñones y muchos otros vegetales. Aunque su inactivación es posible en sistemas modelo, es difícil en alimentos (Gomes y Ledward, 1996). Para ello se necesitan combinaciones de presión y temperatura elevada. La actividad enzimática se puede recuperar parcialmente a lo largo del mantenimiento en almacenamiento del alimento después del tratamiento (Anese, Nicoli, Dall'Aglio y Lerici, 1995). Unas condiciones de pH adecuadas pueden permitir su inactivación completa, como en el caso del puré de aguacate en el guacamole tratado por alta presión que se comercializa en Estados Unidos.

2.6.5 Efectos en los microorganismos

En 1899 se realizaron las primeras experiencias con el uso de alta presión para inactivar microorganismos y así prolongar la conservación de leche (Hite, 1899). Se consiguieron 6 reducciones decimales en la carga microbiana de la leche mediante un tratamiento de 689 MPa durante 10 min a temperatura ambiente.

Con la acumulación de observaciones realizadas desde entonces se ha observado que la inactivación de los microorganismos es dependiente de la especie microbiana (e incluso de la cepa), de las características del medio en que se encuentran los microorganismos, y de las condiciones de tratamiento (presión, tiempo y temperatura). El aumento de la magnitud de la presión aplicada generalmente aumenta la letalidad producida, pero el incremento del tiempo de tratamiento no necesariamente aumenta la inactivación producida. En algunos casos se ha encontrado que la inactivación respondía a una cinética de primer orden (Gervilla, Mor-Mur, Ferragut y Guamis, 1999; Mussa, Ramaswamy y Smith, 1996; Palou, López Malo, Barbosa Canovas, Welti Chanes y Swanson, 1997; Zook, Parish, Braddock y Balaban, 1999). En otros casos se han encontrado desviaciones a este primer orden. Heinz *et al.* (1996), tratando células vegetativas de *Bacillus subtilis* en solución Ringer observó curvas de inactivación asimétricas. Una parte de la población forma parte de una cola que presenta una mayor resistencia a la presión, sugiriendo que los cultivos eran heterogéneos con respecto a este carácter (García Graells, Hauben y Michiels, 1998). En un estudio con *Escherichia coli*, Hauben *et al.* (1998) varió los niveles de calcio en el medio, aumentando la proporción de bacterias tolerantes a la presión, pero sin que variase la tasa de inactivación. De acuerdo con sus resultados propone que el mecanismo de desestabilización se encuentra relacionado con compuestos que ligan Ca^{2+} .

El modo de acción de la alta presión en los microorganismos es dependiente del nivel de presión. Dentro del intervalo de 30 a 50 MPa la expresión génica y la

síntesis de proteínas pueden verse influenciada. Se produce una interrupción en la transcripción a nivel de ribosomas, impidiendo la normal síntesis proteica. A presiones de alrededor de 100 MPa la membrana nuclear de las levaduras se ve afectada. A partir de 400-600 MPa aparecen alteraciones adicionales en las mitocondrias y el citoplasma (Smelt, 1998).

La presión afecta a las membranas celulares, provocando fugas del material citoplasmático. Este daño afecta a las bacterias activas, pero apenas tiene efecto en las células que se encuentran en estado latente. Las membranas presurizadas normalmente muestran alterada su permeabilidad. Se produce una reducción de volumen junto con una reducción en el área transversa de las moléculas de fosfolípidos. Se considera que el lugar primario de daño por presión en los microorganismos es la membrana celular. El mal funcionamiento de la membrana inducido por la presión provoca la inhibición de la incorporación de aminoácidos probablemente causada por la desnaturalización proteica de los transportadores de membrana. El daño causado por la presión elevada ha sido comparado con el producido por alta temperatura y estrés oxidativo en levaduras (Iwahashi, Fujii, Obuchi, Kaul, Sato y Komatsu, 1993). La membrana fue identificada como el lugar primario de lesión celular. La ATPasa de membrana puede ser el componente clave en la intolerancia a varios factores de estrés ambiental en *Saccharomyces spp.*, según Iwashasi y col (1993).

Las bacterias con un contenido relativamente elevado de difosfatidil glicerol, conocido por causar rigidez en las membranas en presencia de calcio, son más susceptibles a la inactivación por alta presión (Smelt, Rijke y Hayhurst, 1994). Del mismo modo los compuestos que favorecen la fluidez de la membrana tienden a conferir a la célula una mayor resistencia a la presión (Russell, Evans, Steeg, Hellemons, Verheul y Abbe, 1995). Yano *et al.* (Yano, Nakayama, Kishihara y Saito, 1998) estudiaron los lípidos de membrana de dos cepas bacterianas recuperadas del intestino de peces de gran profundidad, 16C1 barófilo facultativo y 2D2 barófilo obligado. Existe una mayor presencia de ácidos grasos insaturados de cadena larga que en los procariotas no extremófilos, especialmente DHA, con una tendencia a una mayor proporción en las células cultivadas a mayor presión (hasta 62,1 MPa). Estos resultados sugieren que el DHA juega un importante papel en el mantenimiento de la fluidez de membrana bajo presión. La misma adaptación se observó para el crecimiento a bajas temperaturas.

Numerosos estudios han mostrado la perdida de material intracelular de los microorganismos tratados por alta presión. La pérdida de estos componentes desde el interior de las células indica la existencia de daño en la membrana celular, correlacionando la mayor cantidad de material extravasado con un mayor grado de letalidad y daño celular (Institute of Food Technologists, 2000).

La observación mediante microscopía electrónica de barrido de células intactas tratadas a presiones superiores a 500 MPa muestra una disrupción física de su superficie. A presiones inferiores a 500 MPa es posible observar daño

intracelular mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión. Perrier-Cornet *et al.* (Perrier-Cornet, Marechal y Gervais, 1995) midieron los cambios de volumen durante la aplicación de alta presión mediante un sistema de análisis de imágenes conectado a un microscopio óptico. La presión de 250 MPa generó una compresión del 25% en *Saccharomyces* spp., con una irreversibilidad parcial en la compresión celular del 10% cuando se volvió a presión atmosférica. La transferencia de masa implicó la rotura celular o un incremento en la permeabilidad de la membrana.

La observación microscópica de cultivos celulares bajo presión ha permitido observar el fenómeno de cambio de morfología bacteriana. Se conoce que la presión elevada causa una elongación en las células procariotas. Koyama *et al.* (2001) propusieron que la elongación de *Escherichia coli* inducida por presión se debe a un mal funcionamiento de las proteínas implicadas en la división celular. La forma alargada se debería a una interrupción del proceso de división.

Se ha comprobado que un tratamiento de 200 a 300 MPa durante 5 a 15 minutos a 25 °C inactiva distintas especies de *Vibrio* (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. cholerae* O:1 ATCC 14035, *V. cholerae* no-O:1 ATCC 14547, *V. hollisae* ATCC 33564 y *V. mimicus* ATCC 33653) (Berlin, Herson, Hicks y Hoover, 1999). Como ejemplo de aplicación, este tratamiento debería ser capaz de producir ostras crudas microbiológicamente seguras, sin afectar a su textura y sin producir un sabor de producto procesado.

La inactivación de virus ha sido explorada por distintos investigadores. Se ha observado la disociación de partículas víricas bajo presión (Da Poian, Oliveira, Gaspar, Silva y Weber, 1993; Silva y Weber, 1988). Los resultados más excitantes se encuentran relacionados con la inactivación de virus patógenos para humanos, así el virus del herpes (Nakagami *et al.*, 1992) o el VIH (Jurkiewicz, Villas-Boas, Silva, Weber, Hunsmann y Clegg, 1995; Nakagami, Ohno, Shigehisa, Otake y Mori, 1996). La inactivación de virus mediante tratamientos de alta presión abre una nueva vía de preparación de vacunas, ya que las partículas víricas inactivadas de esta forma presentan una alta capacidad de sensibilización (Silva, Luan, Glaser, Voss y Weber, 1992).

Las teorías que explican la inactivación de las células vegetativas de microorganismos incluyen la desnaturalización de proteínas y enzimas, el daño en los mecanismos de replicación y de transcripción del material genético, solidificación de los lípidos de membrana, especialmente los fosfolípidos, y la rotura de las membranas, con pérdida de la integridad celular. Las esporas son muy resistentes a la presión, pero pueden ser destruidas mediante combinaciones de presión con elevadas temperaturas, ciclos de presurización o tratamientos combinados con bacteriocinas.

2.6.6 *Influencia del pH, actividad de agua y temperatura*

La compresión de los alimentos puede provocar una variación en el pH en función de la presión aplicada. Heremans (1995) mostró una disminución de 0,2 unidades de pH cada 100 MPa en zumo de manzana. El sentido de la variación del pH y su magnitud deben ser determinados para cada producto y procesado de alimentos. La instrumentación para la medida rutinaria de pH a presiones entre 100 y 800 MPa debe ser desarrollada, no siendo todavía disponible.

No existe información sobre la magnitud y el sentido de la variación de la actividad de agua en función de la presión, en caso de que se produzca. Oxen y Knorr (1993) demostraron que una reducción de la actividad de agua (medida a 0,1 MPa) de 0,98-1,00 a 0,94-0,96 produjo una marcada reducción en las tasas de inactivación de microorganismos suspendidos en un alimento. La reducción en la actividad de agua parece proteger los microorganismos contra la inactivación por alta presión. Puede esperarse que los microorganismos que sufren daños subletales durante el tratamiento de alta presión vean inhibida su recuperación por la baja actividad de agua. En consecuencia el efecto neto de la actividad de agua resulta difícil de predecir (Institute of Food Technologists, 2000).

Linton (1999) demostró un marcado efecto del pH en la inactivación de *Escherichia coli* O157H:7. La bajada del pH hace a los microorganismos más sensibles a la presión, y las células dañadas subletalmente no consiguen ser reparadas. Estas observaciones indican que pH y actividad de agua son factores de proceso críticos para la inactivación de microorganismos en alimentos. Su control debería ser incluido en los planes APPCC para el tratamiento de alimentos. La influencia del pH en la supervivencia de los microorganismos dañados por la presión está ilustrada en los trabajos de García Graells *et al.* (García Graells *et al.*, 1998) y Pagán *et al.* (2001). En este último trabajo se trataron cultivos en fase estacionaria de *Escherichia col* C9490, una cepa resistente a la presión. A partir de 200 MPa la letalidad aumentó con la presión aplicada. La conservación a pH inferior a 4,5 causó la muerte de las bacterias que sobrevivieron al tratamiento de alta presión, demostrando la inactivación de células dañadas por presión en medios ácidos.

El incremento de la temperatura por encima de la ambiental, y en menor medida su disminución por debajo de la temperatura ambiente, aumenta la inactivación de microorganismos durante el tratamiento de alta presión. Temperaturas en el intervalo de 45 a 50 °C aumentan la inactivación de patógenos y alterantes, y resulta apropiado desarrollar procesos que incorporen una temperatura de tratamiento en este intervalo. Temperaturas de tratamiento de 90-110 °C en conjunción con presiones de 500-700 MPa han sido usadas para inactivar bacterias esporuladas como *Clostridium botulinum*.

2.7 TECNOLOGÍA Y EQUIPOS

Los equipos discontinuos de alta presión isostática constan de un recipiente cilíndrico en el que se realiza el tratamiento, con dos cierres y un sistema para mantener los cierres en su sitio (yunque, pasadores, rosca,...), un sistema de generación de alta presión compuesto de una bomba de baja presión y un intensificador de presión, un sistema regulador de temperatura y un fluido transmisor de presión. El sistema discontinuo puede tratar alimentos envasados, mientras que en un sistema semicontinuo podrían tratarse alimentos líquidos no envasados.

Los equipos de laboratorio tienen recipientes de presión con volúmenes de 0,1 a 2 litros. Los recipientes de planta piloto tienen capacidades de 10 a 25 litros mientras que los equipos industriales pueden tener recipientes con volúmenes de centenares de litros. Un solo intensificador de presión puede operar dos o más recipientes de presión.

En la operación discontinua los alimentos envasados se cargan en el recipiente de presión, éste es sellado y el líquido transmisor de presión es bombeado dentro del recipiente para desplazar todo el aire que pueda permanecer. Cuando el recipiente se encuentra lleno, la válvula de presión se cierra y se bombea agua en el recipiente hasta alcanzar la presión de proceso. La velocidad de compresión es directamente proporcional a la potencia de la bomba de baja presión que alimenta el intensificador de presión. Una bomba de 75 kW puede subir la presión de un recipiente de 50 litros a 680 MPa en 3-4 minutos. Es necesario bombear fluido transmisor de presión dentro del recipiente para compensar la compresión y el ligero aumento de volumen del recipiente de presión. A un recipiente de 100 litros, ya lleno, habrá que bombear 15 litros adicionales para alcanzar una presión de 680 MPa (Institute of Food Technologists, 2000). Cuando se alcanza el tiempo de proceso se abre la válvula de presión y el agua usada para la compresión se expande para regresar a la presión atmosférica. Se abre nuevamente el recipiente y los productos envasados son retirados, quedando listos para su distribución. El desplazamiento del aire previo al tratamiento de alta presión se realiza para reducir los costes de bombeo eliminando la necesidad de comprimir el aire. La persistencia de aire residual en la cámara de presurización no tiene efecto alguno en las cinéticas de destrucción de microorganismos en los alimentos tratados por alta presión.

Los recipientes de presurización capaces de operar a presiones superiores a 400 MPa deben ser construidos mediante dos o más cilindros concéntricos de acero de alta fuerza de tensión. Los cilindros externos comprimen los cilindros internos de tal forma que la cámara de presurización se encuentra siempre bajo una compresión residual a la presión de operación para la que se diseña el cilindro. Se requiere que los cilindros internos puedan quebrarse o deformarse para permitir la fuga del fluido y aliviar la presión, evitando el fallo catastrófico del cilindro de presión en forma de explosión. El cilindro externo de un recipiente de presión puede ser de alambre enrollado o encapsulado en un cilindro lleno de líquido para asegurar su estabilidad durante más de 100 000 ciclos. El grosor

de la pared de los recipientes de presurización se encuentra determinado por el diámetro del espacio útil, por la presión máxima de trabajo y por el número máximo de ciclos. El cilindro interior y todas las partes expuestas al agua deben de ser de acero inoxidable para prevenir la corrosión. Los sistemas que usan acero de alta fuerza de tensión (no inoxidable) deben usar algún aceite alimentario o lubricantes autorizados, agentes anticorrosivos y compuestos antimicrobianos como fluidos transmisores de la presión. Los alimentos envasados tratados en sistemas que usen un lubricante deben ser protegidos durante el tratamiento de alta presión envueltos en una bolsa sellada. Se prefiere diseñar equipos de tratamiento de alimentos por alta presión con las partes en contacto con el alimento de acero inoxidable, de esta forma se puede utilizar agua potable filtrada como fluido de compresión isostática.

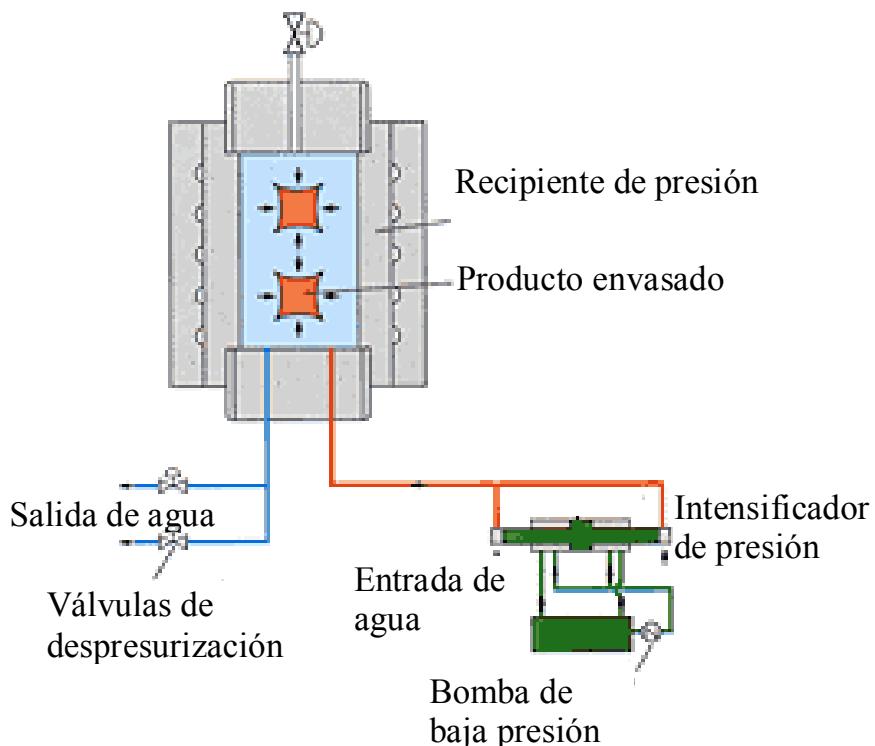


Figura 1. Esquema de un equipo discontinuo de alta presión

El elevado coste de los recipientes de presión, bombas, intensificadores y sistemas de cierre requieren que el sistema realice tantos ciclos por hora como sea posible dado el tiempo de mantenimiento de la presión necesario para tratar el alimento. Se están diseñando sistemas capaces de realizar el proceso de carga y descarga en 2 minutos, más el tiempo de mantenimiento bajo presión. Son deseables tiempos de tratamiento cortos, de 5 minutos o menos, para amortizar mejor el equipo. El coste estimado de un tratamiento de 500 MPa es de unos 0,17 € por kg de producto, según A. Hernando Sáiz, de NC Hyperbaric. La tecnología de alta presión estará limitada seguramente a tratamientos de no más de 10 minutos (Institute of Food Technologists, 2000), en contraste con los tratamientos térmicos discontinuos que requieren tiempos de 60 minutos para completar un ciclo.

En los equipos discontinuos (Figura 1) el alimento se coloca dentro del recipiente de presurización envasado con material flexible, preferentemente al vacío. El material de envase separa el alimento del líquido transmisor de presión.

Los equipos industriales acostumbran a estar equipados de sistemas de cierre de rosca interrumpida, que permiten maniobras de apertura y cierre rápidos. De este modo se puede aumentar la productividad de los equipos al reducir los tiempos de carga y descarga. Para tratamientos discontinuos se prefieren los equipos en que el cilindro se encuentra dispuesto horizontalmente y ambos cierres pueden abrirse simultáneamente. El producto entrante empuja al producto tratado, minimizándose los riesgos de cruzamiento entre productos tratados y no tratados. El diseño de estos equipos es más complejo, pero su operación es más cómoda.

En los equipos semicontinuos (Figura 2) el alimento líquido llena el cilindro, y es comprimido por un émbolo que a su vez es impulsado por el fluido a alta presión.

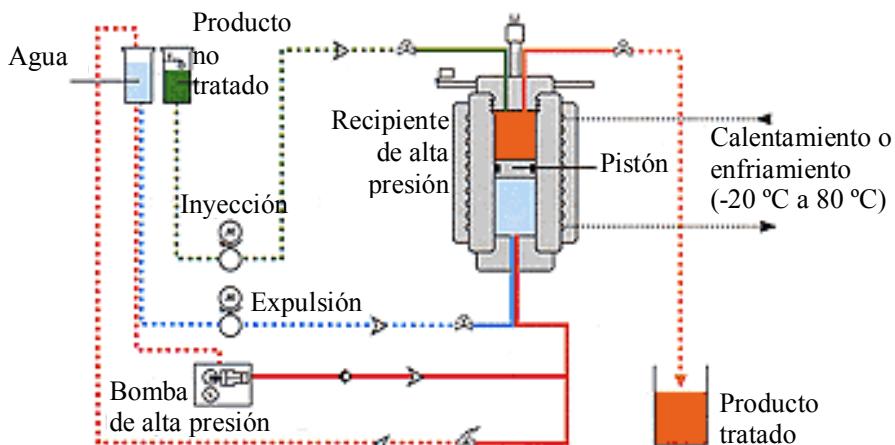


Figura 2. Esquema de un equipo semicontinuo de alta presión

El multiplicador de presión utiliza la relación de áreas entre las caras expuestas a la zona de alta y a la de baja presión para aumentar la presión. Esta relación de superficies, y por tanto de multiplicación de presión, es de hasta 1000 veces. La presión aumenta dentro del cilindro al ir bombeando el fluido dentro del recipiente de presurización, hasta alcanzar el valor de presión preseleccionado. A partir de este momento se cierran las válvulas y se mantiene la presión durante el tiempo prefijado sin consumo energético adicional.

Al aumentar la presión se produce un calentamiento adiabático. La magnitud del calentamiento depende de las características del alimento, pero para la mayoría de ellos el comportamiento es análogo a la del agua, con un aumento de 2-3 °C cada 100 MPa para el agua a 20 °C. En los alimentos grasos puede esperarse un incremento mayor de la temperatura (Otero, Molina García y Sanz, 2000). El calentamiento es instantáneo e igual en todos los puntos del alimento, si su composición es homogénea. Para mantener la temperatura de tratamiento estable y minimizar el calentamiento adiabático el calor generado debe ser eliminado mediante un medio de calentamiento o refrigeración que

circula por una doble camisa del cilindro. Los intercambios de calor a través de las paredes del recipiente de presión pueden causar gradientes de temperatura en el producto tratado. Cuando se baja la presión se produce un enfriamiento de igual magnitud que el calentamiento producido durante el incremento de presión.

Las presiones habituales para las aplicaciones de alta presión isostática se encuentran entre 100-900 MPa (1 MPa \approx 10 atm.), con un límite superior en aumento siguiendo el ritmo de desarrollo de equipos fiables y asequibles. La principal ventaja de esta técnica es la inmediata transmisión de la presión a toda la masa del alimento tratado y la homogeneidad del tratamiento en toda la pieza, independiente de su forma o dimensiones.

Las aplicaciones de los tratamientos de alta presión están creciendo de forma continuada, incluyendo mermeladas, guacamole, zumo de naranja, jamón cocido loncheado, ostras crudas, leche líquida, entre los más relevantes.

Durante el tratamiento de alta presión se produce una reducción de volumen. Una expansión equivalente se produce durante la despresurización. Es por esta razón que los envases utilizados para tratar alimentos mediante alta presión deben ser capaces de acomodarse a variaciones de un 15% en su volumen sin perder sus propiedades de barrera o la integridad de su cierre.

Al no existir un aumento significativo de temperatura del alimento se mantienen características muy cercanas a las del producto no tratado.

Meyer *et al.* (2000) han propuesto utilizar el calentamiento adiabático para un tratamiento combinado de temperatura y presión de alta temperatura y corto tiempo de tratamiento. La temperatura del producto podría subir de 100 a 120 °C mediante una rápida compresión a 700 MPa y volver a 100 °C mediante una rápida descompresión. El uso del calor de compresión puede resultar de gran interés en productos sólidos de gran volumen, ya que el aumento de temperatura es instantáneo y en todo el volumen de la pieza, a diferencia de los tratamientos de calentamiento convencionales, siendo más uniforme que el calentamiento mediante microondas.

2.7.1 Principales áreas de aplicación

Uno de los métodos estándar para destruir las bacterias en los alimentos es la aplicación de calor. Por ejemplo, una lata de guisantes se calienta a 120 °C durante una hora. Este tratamiento destruye las bacterias, pero también altera la textura de los guisantes y su color, por lo que hay que añadir clorofilas para devolverles su color normal. La alta temperatura también destruye las moléculas responsables del aroma, convirtiéndolas en moléculas que no tienen tan buen sabor. Pero la alta presión puede destruir las bacterias sin perdidas de sabor.

La conservación de los alimentos puede mejorarse mediante la eliminación, o una sustancial reducción, de los microorganismos alterantes. De esta forma se consigue una extensión en la vida comercial de los productos refrigerados manteniendo una calidad sensorial superior. Ejemplos comercializados de este

tipo de productos son zumos de frutas, mermeladas, guacamole, salsas, productos cárnicos, lácteos y de la pesca.

En Japón el *yomogimochi* es una exquisitez que se come durante las celebraciones de Año Nuevo. Consiste en una pasta de arroz cocido al vapor mezclado con una hierba y con una pasta de judías rojas en su interior. El *yomogimochi* normalmente se prepara para su consumo inmediato, y el que puede encontrarse en las tiendas no tiene el sabor del *yomogimochi* preparado en casa. Hayashi, de la Universidad de Kyoto, usó alta presión para tratar *yomogimochi*, encontrando que sabe tan bien como el preparado en casa (Hill, 1997). En 1996 los japoneses gastaron un millón de dólares en comprar esta exquisitez tratada por alta presión.

En Japón fue donde se adoptó en primer lugar esta nueva técnica de conservación de alimentos. Pueden adquirirse en las tiendas deliciosas mermeladas de frutas, yogures y zumos de fruta. De hecho la presurización elimina parte el amargor del zumo de pomelo, haciéndolo más popular (Hill, 1997). Flow International, el mayor proveedor de equipos de alta presión, ha instalado más de 70 equipos industriales.

La industria de procesado de ostras en Estados Unidos ha demostrado un gran interés en la tecnología de alta presión. Y no únicamente para destruir *Vibrio*, sino también para abrir la concha (He, Adams, Farkas y Morrissey, 2002). El músculo abductor relaja su esfuerzo y las valvas se abren unos tres milímetros. Esto ayuda en el trabajo de retirar la carne de los bivalvos. Además de reducir los costes de manipulación, la alta presión resulta ser una forma efectiva de añadir valor al producto. Motivatif Seafoods en Houma, Luisiana, incorporó a su fábrica dos unidades de 45 litros hace dos años. Nisbett Oyster Co. en Willapa Bay, Washington, recientemente le imitó, y Joey's Oysters Inc. en Amite, Luisiana, instaló una unidad de 215 litros (Higgins, 2001). En Europa se aprecian las ostras vivas, y su procesado por alta presión no será efectivo para el mercado europeo.

Se están desarrollando productos que se puedan conservar sin refrigeración, tanto acidificados como productos de baja acidez. En julio de 2001, Flow formó una sociedad con Kraft Foods, Procter and Gamble, U.S. Army Soldier Systems Command e Illinois Institute of Technology's National Center for Food Safety and Technology para desarrollar conjuntamente la tecnología de alta presión para productos de alimentación estables. El proyecto de tres años conllevará una inversión de 2,1 millones de euros dentro del programa del Departamento de Defensa "Dual Use Science and Technology Program", para aplicaciones militares e industriales (Anon., 2001). Dentro de este programa se está recogiendo información para que la FDA y USDA admitan tratamientos de alta presión como equivalentes a la esterilización térmica. Para ello se necesita información cinética de la cepa más termo- y baro-resistente de *Clostridium botulinum*.

La seguridad alimentaria se mejora mediante la eliminación de patógenos como *Salmonella* en ovoproductos, *Listeria* en productos cárnicos, *Vibrio* en ostras.

La otra línea de utilización de la alta presión pasa por la preparación de productos que no pueden ser obtenidos mediante otras tecnologías. Como alternativa a la texturización por calor, las soluciones de proteínas (de huevo, suero lácteo o soja) e hidrocoloides (pectina, almidón) pueden ser tratadas mediante alta presión. Los geles resultantes se caracterizan por sus texturas únicas y especiales, como son los flanes elaborados por presión, con una textura especial y un intenso sabor a huevo (Ponce, Beltrán, Sendra, Mor-Mur, Guamis y Pla, 1999). Las proteínas séricas pueden ser modificadas mediante alta presión para hacerlas más hidrofóbicas. De este modo pueden ser utilizadas para ligar aromas (frecuentemente hidrófobos) y hacerlos estables en alimentos bajos en grasas.

La alta presión isostática ha mostrado ser una excelente herramienta para producir una rápida congelación de los alimentos (Fuchigami, Kato y Teramoto, 1998; Kanda, Aoki y Kosugi, 1992). La congelación asistida por presión se basa en la disminución de la temperatura de congelación por efecto de la presión. Cuando el alimento se encuentra bajo presión se disminuye la temperatura del recipiente de presurización hasta temperaturas bajo cero. La liberación de la presión provoca la inmediata y uniforme congelación del alimento, con formación de cristales de hielo de pequeño tamaño, ayudada por el enfriamiento adiabático (Knorr, Schlueter y Heinz, 1998). Del mismo modo pueden descongelarse de forma rápida alimentos en los que los cristales de hielo desaparecen al someterlos a presión, subiendo la temperatura antes de liberar la presión (Yanyun, Flores y Olson, 1998; Zhao, Flores y Olson, 1996).

Los compuestos termosensibles pueden ser estabilizados mediante el potencial único que ofrece la alta presión. Esta utilidad es especialmente interesante para aromas, nutrientes y compuestos activos biológicamente.

Algunas enzimas pueden activarse bajo presión, produciendo velocidades de reacción mayores y menores tiempos de procesado.

2.8 BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo (2001). MANUFACTURING NEWS: Perdue adopts Ultra-High-Pressure to fight pathogens. <http://www.foodengineering.org/articles/2001/0401/0401mfgnews.htm> Consultado el 27/5/2002.
- Ammar El Tahra, M. A., El Shazly, A., Nasr, M. M., El Saadany, M. y El Tahra, M. A. A. (1994). Effect of using autolyzed starter and cheese slurry on acceleration of Ras cheese ripening made from mixture of goat's and cow's milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 22, 67-80.
- Anese, M., Nicoli, M. C., Dall'Aglio, G. y Lerici, C. R. (1995). Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities. *Journal of Food Biochemistry*, 18, 285-293.
- Angsupanich, K. y Ledward, D. A. (1998). High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 63, 39-50.
- Balny, C., Heremans, K., & Masson, P. (1992) Haute pression et biologie: une demarche d'avenir. *Biofutur* , 37-42.
- Battistotti, B., Corradini, C. y Fox, P. F. (1993). Italian cheese. En P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects.* (pp. 221-243). London: Chapman & Hall Ltd.
- Bec, N., Villa, A., Tortora, P., Mozhaev, V. V., Balny, C. y Lange, R. (1996). Enhanced stability of carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* at high pressure. *Biotechnology Letters*, 18, 483-488.
- Berlin, D. L., Herson, D. S., Hicks, D. T. y Hoover, D. G. (1999). Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2776-2780.
- Bhowmik, T. y Marth, E. H. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science*, 73, 859-866.
- Bobe, G., Beitz, D. C., Freeman, A. E. y Lindberg, G. L. (1999). Associations among individual proteins and fatty acids in bovine milk as determined by correlations and factor analyses. *Journal of Dairy Research*, 66, 523-536.
- Buchheim, W. y El Nour, A. M. A. (1992). Induction of milkfat crystallization in the emulsified state by high hydrostatic pressure. *Fett Wissenschaft Technologie*, 94, 369-373.
- Butz, P., Zielinski, B., Ludwig, H., & Tauscher, B. (1999) The influence of high pressure on the autoxidation of major unsaturated fatty acid constituents of milk. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology* , 367-369. Heidelberg, Springer.
- Canut, E. (2000). Queso de la Garrotxa. En E. Canut (Ed.), *Los 100 Quesos Españoles* (p. 43). Barcelona: Salvat Editores, S.A.

- Cheah, P. B. y Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43, 123-134.
- Cheftel, J. C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France*, 81, 13-38.
- Da Poian, A. T., Oliveira, A. C., Gaspar, L. P., Silva, J. L. y Weber, G. (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *J. Mol. Biol.*, 231, 999-1008.
- de Ruyter, P. G. G. A., Kuipers, O. P., Meijer, W. C. y de Vos, W. M. (1997). Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nature Biotechnology*, 15, 976-979.
- Dumay, E., Lambert, C., Funtenberger, S. y Cheftel, J. C. (1996). Effects of high pressure on the physico-chemical characteristics of dairy creams and model oil/water emulsions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 606-625.
- Eberhard, P., Strahm, W. y Eyer, H. (1999). High pressure treatment of whipped cream. *Agrarforschung*, 6, 352-354.
- El Soda, M., Madkor, S. A. y Tong, P. S. (1999). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 3. Properties of heat-shocked adjuncts in buffer and cheese slurry systems. *Milchwissenschaft*, 54, 262-265.
- El Soda, M. y Pandian, S. (1991). Recent developments in accelerated cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 74, 2317-2335.
- Ezzat, N. (1990). Accelerated ripening of Ras cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Propionibacterium freudenreichii* and *Brevibacterium linens*. *Lait Lyon*, 70, 459-466.
- Fernández García, E., López Fandiño, R. y Alonso, L. (1994). Effect of a food-grade enzyme preparation from *Aspergillus oryzae* on free fatty acid release in Manchego-type cheese from ovine and bovine milk. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 199, 262-264.
- Fernández García, E., Olano, A., Cabezudo, D., Martín Alvarez, P. J. y Ramos, M. (1993). Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 519-524.
- Fertsch, B., Müller, M. y Hinrichs, J. (2002). Pressure-induced gelling of whey protein and casein modulated by holding time and rate of pressure release. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Submitted
- Folkertsma, B., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal*, 6, 1117-1134.
- Fox, P. F. y Law, J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*, 5, 239-262.

- Fox, P. F., Lucey, J. A. y Cogan, T. M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 237-257.
- Fox, P. F., Wallace, J. M., Morgan, S., Lynch, C. M., Niland, E. J. y Tobin, J. (1996). Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 271-297.
- Fuchigami, M., Kato, N. y Teramoto, A. (1998). High-pressure-freezing effects on textural quality of Chinese cabbage. *Journal of Food Science*, 63, 122-125.
- Funtenberger, S., Dumay, E. M. y Cheftel, J. C. (1995). Pressure-induced aggregation of beta-lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 410-418.
- García Graells, C., Hauben, K. A. y Michiels, C. W. (1998). High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1566-1568.
- Garde, S., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (1997). Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnology Letters*, 19, 1011-1014.
- Gervilla, R., Ferragut, V. y Guamis, B. (2001). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Food Science*, 66, 880-885.
- Gervilla, R., Mor-Mur, M., Ferragut, V. y Guamis, B. (1999). Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated in ewe's milk by high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 16, 173-184.
- Gomes, M. A. y Ledward, D. A. (1996). Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chemistry*, 56, 1-5.
- Gomes, M. A., Sumner, I. G. y Ledward, D. A. (1997). Effects of high pressure on papain activity and structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 67-72.
- Gripon, J. C. y Fox, P. F. (1993). Mould-ripened cheeses. En P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects*. (pp. 111-136). London: Chapman & Hall Ltd.
- Hauben, K. A., Bernaerts, K. y Michiels, C. W. (1998). Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 678-684.
- Hayakawa, I., Linko, Y. Y. y Linko, P. (1996). Mechanism of high pressure denaturation of proteins. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 756-762.
- He, H., Adams, R. M., Farkas, D. F. y Morrissey, M. T. (2002). Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. *Journal of Food Science*, 67, 640-645.

- Heinz, V. & Knorr, D. (1996) Description of high pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* by a distributional function., 175. 1996 IFT annual meeting: book of abstracts.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. y Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 197-203.
- Heremans, L. y Heremans, K. (1989). Raman spectroscopic study of the changes in secondary structure of chymotrypsin: Effect of pH and pressure on the salt bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, no. 2, 192-197.
- Higgins, K. T. (2001). Out with the Old....
<http://www.foodengineering.org/articles/2001/0601/0601nonther.htm> Consultado el 27/5/2002.
- Hill, S. (1997). Squeezing the death out of food. *New Scientist magazine*, 54, 28.
- Hite, B. H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin*, 58, 15-35.
- Institute of Food Technologists (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. High Pressure. <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html> Consultado el 27/5/2002.
- Iwahashi, H., Fujii, S., Obuchi, K., Kaul, S. C., Sato, A. y Komatsu, Y. (1993). Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 53-58.
- Izco, J. M., Torre, P. y Barcina, Y. (1999). Accelerated cheese ripening. A review. *Alimentaria*, 36, 135-144.
- Jaenicke, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry*, 202 , 715-728.
- Jin, Y. K. y Park, Y. W. (1996). SDS-PAGE of proteins in goat milk cheeses ripened under different conditions. *Journal of Food Science*, 61, 490-494, 503.
- Johnston, D. E. (2000). The effects of freezing at high pressure on the rheology of Cheddar and Mozzarella cheeses. *Milchwissenschaft*, 55, 559-562.
- Johnston, D. E., Austin, B. A. y Murphy, R. J. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 47, 760-763.
- Jurkiewicz, E., Villas-Boas, M., Silva, J. L., Weber, G., Hunsmann, G. y Clegg, R. M. (1995). Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6935-6937.
- Kalichevsky, M. T., Knorr, D. y Lillford, P. J. (1995). Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 253-259.

- Kanda, Y., Aoki, M. y Kosugi, T. (1992). Freezing of tofu (soybean curd) by pressure-shift freezing and its structure. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi [Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology]*, 39, 508-614.
- Kanehisa, H. y Okai, H. (1984). Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. V. Bitterness of the synthetic N-terminal analog of des-gly-BPIa (Arg-Pro-Pro-Phe-Ile-Val). *Bulletin of the Chemistry Society of Japan*, 57, 301.
- Kanno, C., Uchimura, T., Hagiwara, T., Ametani, M. y Azuma, N. (1998). Effect of hydrostatic pressure on the physicochemical properties of bovine milk fat globules and the milk fat globule membrane. En N. Isaacs (Ed.), *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry* (p. 182). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Kawabata, S., Vassal, L., Le Bars, D., Cesselin, B., Nardi, M., Gripon, J. C. y Chapot Chartier, M. P. (1997). Phage-induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Lait*, 77, 229-239.
- Khalid, N. M. y Marth, E. H. (1990). Lactobacilli - their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 73, 2669-2684.
- Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G. y Fox, P. F. (1998). Enzyme-modified cheese. *International Dairy Journal*, 8, 1-10.
- Knorr, D., Schlueter, O. y Heinz, V. (1998). Impact of high hydrostatic pressure on phase transitions of foods. *Food Technology*, 52, 42-45.
- Kosikowski, F. V. y Iwasaki, T. (1974). Changes in Cheddar cheese by commercial enzyme preparations. *Journal of Dairy Science*, 963-970.
- Koyama, S., Miwa, T., Sato, T. y Aizawa, M. (2001). Optical chamber system designed for microscopic observation of living cells under extremely high hydrostatic pressure. *Extremophiles*, 5, 409-415.
- Lariviere, B., El Soda, M., Soucy, Y., Trépanier, G., Paquin, P. y Vuillemand, J. C. (1991). Microfluidized liposomes for the acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*, 1, 111-124.
- Law, A. J. R., Leaver, J., Felipe, X., Ferragut, V., Pla, R. y Guamis, B. (1998). Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2523-2530.
- Lee, S. K., Anema, S. G., Schrader, K. y Buchheim, W. (1996). Effect of high hydrostatic pressure on Ca-caseinate systems. *Milchwissenschaft*, 51, 17-21.
- Linton, M., McClements, J. M. J. y Patterson, M. F. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. *Journal of Food Protection*, 62, 277-279.
- Manning, D. L., Ridout, E. A. y Price, J. C. (1984). Non-sensory methods for cheese flavour assessment. En F. L. Davies y B. A. Law (Eds.), *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (pp. 229-253). London, UK: Elsevier Applied Science Publishers.

- Mathews, J. E., Jr., Dow, R. B. y Anderson, A. K. (1940). The effects of high pressure on the activity of pepsin and rennin. *J. Biol. Chem.*, 135, 697-705.
- McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 90, 293-324.
- McSweeney, P. L. H., Walsh, E. M., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D. y Castelo, G. M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 33, 183-192.
- Menendez, S., Centeno, J. A. y Rodríguez Otero, J. L. (1999a). Micrococos en quesos. *Alimentaria*, 36, 65-68.
- Menendez, S., Centeno, J. A., Rodríguez Otero, J. L. y Otero, J. R. (1999b). Enterococos en quesos. *Alimentaria*, 36, 69-73.
- Meyer, R. S., Cooper, K. L., Knorr, D. y Lelieveld, H. M. (2000). High-pressure sterilization of foods. *Food Technology*, 54, 67, 68, 70, 72, 6.
- Morild, E. (1981). The theory of pressure effects on enzymes. *Advances in Protein Chemistry*, 34, 93-165.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. y Balny, C. (1994a). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12, 493-501.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. y Balny, C. (1994b). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12, 493-501.
- Mussa, D. M., Ramaswamy, H. S., & Smith, J. P. (1996) Ultra high pressure processing of milk: destruction kinetics of *Listeria monocytogenes*., 78. 1996 IFT annual meeting: book of abstracts.
- Nakagami, T., Ohno, H., Shigehisa, T., Otake, T. y Mori, H. (1996). Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. *Transfusion*, 36, 475-476.
- Nakagami, T., Shigehisa, T., Ohmori, T., Taji, S., Hase, A., Kimura, T. y Yamanishi, K. (1992). Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *Journal of Virology Methods*, 38, 255-262.
- Ney, K. H. (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. En J. C. Bondreau (Ed.), *Food Taste Chemistry* Washington D.C.: American Chemical Society.
- Otero, L., Molina Garcia, A. D. y Sanz, P. D. (2000). Thermal effect in foods during quasi-adiabatic pressure treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 119-126.

- Oumer, A., Garde, S., Medina, M. y Nuñez, M. (1999). Defined starter system including a bacteriocin producer for the enhancement of cheese flavour. *Biotechnology Techniques*, 13, 267-270.
- Oxen, P. y Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 26, 220-223.
- Pagán, R., Manas, P., Alvarez, I. y Condon, S. (1999). Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 16, 139-148.
- Palou, E., López Malo, A., Barbosa Canovas, G., Welti Chanes, J. y Swanson, B. G. (1997). Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30, 703-708.
- Perrier-Cornet, J. M., Marechal, P. A. y Gervais, P. (1995). A new design intended to relate high pressure treatment to yeast cell mass transfer. *Journal of Biotechnology*, 41, 49-58.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 78, 1238-1247.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (1997). Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters*, 19, 345-348.
- Picon, A., Serrano, C., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (1996). The effect of liposome-encapsulated cyprosins on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 79, 1699-1705.
- Ponce, E., Beltrán, E., Sendra, E., Mor-Mur, M., Guamis, B. y Pla, R. (1999). Development of a cream caramel by high hydrostatic pressure at low temperature. En H. Ludwig (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology* (pp. 341-344). Heidelberg (D): Springer.
- Prado Alderete, B., Arancibia, M., Fuentes, M., Zazopulos, M. y Del Moral, A. (1993). Numerical taxonomic study of bacteria isolated from goat milk cheese using selective culture media. *Boletín Micológico*, 8, 35-42.
- Pratginestos, F. y Romero del Castillo, R. (1998). Producció actual del formatge de Pell Florida o Garrotxa [Present production of Pell Florida or Garrotxa cheese]. *Pastors*, 14, 10-12.
- Prehoda, K. E., Mooberry, E. S. y Markley, J. L. (1999). High Pressure Effects on Protein Structure. En J. F. Lefèvre y O. Jardetzky (Eds.), *Protein Dynamics, Function and Design* Dordrecht, NL: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Reps, A. (1993). Bacterial surface-ripened cheeses. En P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects*. (pp. 137-172). London: Chapman & Hall Ltd.

- Rodríguez, J., Requena, T., Goudedranche, H., Maubois, J. L. y Juarez, M. (1996). Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltered milk by using a Lac- Prt- strain of lactococci. *Lait*, 76, 513-522.
- Rovere, P. (1995). The third dimension of food technology. *Tecnologie alimentari*, 4, 64-78.
- Russell, N. J., Evans, R. I., Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A. y Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 255-261.
- Scollard, P. G., Beresford, T. P., Murphy, P. M. y Kelly, A. L. (2000). Barostability of milk plasmin activity. *Lait*, 80, 609-619.
- Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. y Knorr, D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61, 308-310.
- Shigenaga, T., Otagiri, K. y Kanehisa, H. (1984). Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. VII. Bitterness of the retro BPIa (Val-Ile-Phe-Pro-Gly-Arg). *Bulletin of the Chemistry Society of Japan*, 57, 103-106.
- Silva, J. L., Luan, P., Glaser, M., Voss, E. W. y Weber, G. (1992). Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *Journal of Virology Methods*, 66, 2111-2117.
- Silva, J. L. y Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.*, 199, 149-159.
- Smeller, L., Goossens, K. y Heremans, K. (1995). Determination of the secondary structure of proteins at high pressure. *Vibrational Spectroscopy*, 8, 199-203.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 152-158.
- Smelt, J. P. P. M., Rijke, A. G. F. y Hayhurst, A. (1994). Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research*, 12, 199-203.
- Sørhaug, T. y Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 35-41.
- Thakar, P. N. y Upadhyay, K. G. (1992). Cheese curd slurry - a review. *Cultured Dairy Products Journal*, 27, 9, 11-9, 12.
- Tzanetakis, N. y Litopoulou Tzanetaki, E. (1989). Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 7, 73-80.
- Van Camp, J., Messens, W., Clement, J. y Huyghebaert, A. (1997). Influence of pH and sodium chloride on the high pressure-induced gel formation of a whey protein concentrate. *Food Chemistry*, 60, 417-424.
- Visser, S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350.

- Wallace, J. M. y Fox, P. F. (1997). Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal*, 7, 157-167.
- Williams, A. G. y Banks, J. M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal*, 7, 763-774.
- Yano, Y., Nakayama, A., Kishihara, S. y Saito, H. (1998). Adaptive changes in membrane lipids of barophilic bacteria in response to changes in growth pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 479-485.
- Yanyun, Z., Flores, R. A. y Olson, D. G. (1998). High hydrostatic pressure effects on rapid thawing of frozen beef. *Journal of Food Science*, 63, 272-275.
- Yasuda, A. y Mochizuki, K. (1992). The behaviour of triglycerides under high pressure: the high pressure can stably crystallize cocoa butter in chocolate. En C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson (Eds.), *High Pressure and Biotechnology* (pp. 255-260). London, UK: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.
- Yokoyama, H., Sawamura, N. y Motobayashi, N. (1992) Method for accelerating cheese ripening. Patent European Patent EP 0 469 857 A1.
- Zhao, Y., Flores, R. A., & Olson, D. G. (1996) The action of high hydrostatic pressure on the thawing of frozen meat., 81. 1996 IFT annual meeting: book of abstracts.
- Zook, C. D., Parish, M. E., Braddock, R. J. y Balaban, M. O. (1999). High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices. *Journal of Food Science*, 64, 533-535.