



C. E. R. PLANTA DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS



DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

ESTUDI DEL TRACTAMENT TÈRMIC I PER ALTA PRESSIÓ EN LES PROTEÏNES I ESTRUCTURES PROTEIQUES DE LA LLET DE CABRA

MEMÒRIA PRESENTADA PER OPTAR
AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIA I
TECNOLOGIA DELS ALIMENTS

XAVIER FELIPE CUYÀS
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2000

BUENAVENTURA GUAMIS LOPEZ, Catedràtic de Tecnologia dels Aliments, i REYES PLA SOLER, Professora Titular de Tecnologia dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

FAN CONSTAR: Que el llicenciat en Veterinària Xavier Felipe Cuyàs ha realitzat, sota la seva direcció, a l'Àrea de Tecnologia dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball titulat "Estudi del tractament tèrmic i per alta pressió en les proteïnes i estructures proteiques de la llet de cabra" que presenta per optar al grau de Doctor.

I perquè així consti firmem el present document a Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), el 6 de setembre de 2000.

Buenaventura Guamis López

Reyes Pla Soler

AGRAÏMENTS

A Buenaventura Guamis, per oferir-me la possibilitat de fer la tesi, per vetllar durant tots aquests anys pel meu finançament. Agraeixo especialment els teus ànims, la teva confiança i les indicacions que durant tot aquest temps m'han portat a fer aquest treball.

A Reyes Pla, pel teu sentit pràctic, les teves gestions i pels suggeriments, que han estat d'una gran utilitat.

To Andrew Law. Your honesty and your fair deal has impressed me. Thanks very much for all I have learned from you.

A la meva mare, al meu pare i als meus germans. Certament un tresor preciós. El vostre amor i ajut en tots els sentits no té preu.

Al Déu de la tendresa, flama viva dins el meu cor, que m'ha portat en braços quan les meves forces afeblien, i ja no volia caminar.

A la meva estimada Anna, pels ànims i estimació rebuts en el darrer any.

Al Ramón Gervilla i a la Marta Capellas, per la vostra comprensió i per compartir tantes coses durant aquests anys.

A l'Esther, al Toni i a la Pili, per tots els petits detalls d'ajuda que m'han fet el treball menys feixuc.

A l'Eduard Ponce, en Josep Yuste, en Xavi Lodos, la Mireia Roca i la Marta Pavia. Sempre m'heu alegrat la vida.

A totes les persones que formen o han format part de la Unitat de Tecnologia dels Aliments i de la Planta Pilot. De cadascú de vosaltres he après alguna cosa bona.

A en Josep M., en Xavier, en Manel, la M. Pilar, la Nuri, en Christian..., per haver-me suportat de bona gana durant tant de temps.

Aquest treball s'ha realitzat amb la financiació aportada:

- Per la Generalitat de Catalunya a través del programa de beques per a la formació de doctors i de professors universitaris en àrees de coneixement deficitàries (1991), i a la borsa de viatges per estades a l'estranger (1994).
- Per la Unió Europea a través dels projectes d'investigació AIR1-CT92-0296 i FAIR-CT96-1113

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. TECNOLOGIES PER A UN PROCESSAMENT MÍNIM DELS ALIMENTS	3
1.1.1. <i>Tractaments de conservació amb aplicació de calor</i>	3
1.1.2. <i>Tractaments de conservació amb energies no calorífiques</i>	6
1.1.3. <i>Alta pressió isostàtica</i>	8
1.1.3.1. Equips de pressurització	9
1.1.3.2. Efecte de l'alta pressió en els components dels aliments	11
1.1.3.3. Efecte de l'alta pressió en els microorganismes	16
1.2. LA LLET I ELS DERIVATS LÀCTICS	16
1.2.1. <i>Les caseïnes</i>	17
1.2.2. <i>Les proteïnes sèriques</i>	19
1.2.3. <i>Enzims endògens</i>	21
1.3. LA LLET DE CABRA	21
1.3.1. <i>La producció de llet</i>	21
1.3.2. <i>Característiques de la llet</i>	22
1.3.3. <i>Efectes dels tractaments tecnològics en els components de la llet</i>	22
1.4. METODOLOGIA UTILITZADA EN L'ESTUDI DE LES PROTEÏNES LÀCTIQUES CAPRINES	24
1.4.1. <i>Fracció soluble a pH 4,6</i>	24
1.4.2. <i>Fracció insoluble a pH 4,6</i>	25
1.4.3. <i>Determinació conjunta de la fracció soluble i insoluble a pH 4,6</i>	26

2. OBJECTIUS GENERALS	27
3. PUBLICACIONS	31
3.1. COMPARISON OF THE EFFECTS OF HIGH-PRESSURE TREATMENT AND HEAT PASTEURIZATION ON THE WHEY PROTEINS IN GOAT'S MILK (FELIPE I COL, 1997).....	35
3.2. PREPARATIVE-SCALE FRACTIONATION OF BOVINE, CAPRINE AND OVINE WHEY PROTEINS BY GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY (FELIPE I LAW, 1997).....	37
3.3. COMPARISON OF THE EFFECTS OF HIGH PRESSURE AND THERMAL TREATMENTS ON THE CASEIN MICELLES IN GOAT'S MILK (LAW I COL, 1998).....	39
4. DISCUSSIÓ.....	41
4.1. ESTRUCTURES MACROMOLECULARS.....	43
4.2. ENLLAÇOS MOLECULARS.....	47
5. CONCLUSIONS	51
6. BIBLIOGRAFIA.....	55

1. INTRODUCCIÓ

1.1. TECNOLOGIES PER A UN PROCESSAMENT MÍNIM DELS ALIMENTS

En els darrers anys, la conscienciació del sobretractament tèrmic a què són sotmesos alguns aliments i el coneixement de les conseqüències que se'n deriven des del punt de vista organolèptic i nutritiu, ha conduït a l'estudi de noves tecnologies que, sense aportar riscos a la salut pública, permetin el tractament i la conservació d'aliments amb el valor nutritiu i les característiques organolèptiques propis dels aliments frescs.

Les tecnologies recollides a continuació no suposen necessàriament una alternativa als tractaments tradicionals, ja sigui pels alts costos associats, la falta de garanties sanitàries o la incapacitat per a destruir enzims que deteriorenen l'aliment. Aquests inconvenients poden resoldre's parcialment o totalment amb la combinació de diferents tecnologies de processament i amb l'aplicació de barreres al creixement de microorganismes, com ara la baixa activitat d'aigua, la baixa temperatura d'emmagatzematge o el descens del pH de l'aliment (Leistner, 1995). En tot cas, l'aplicació d'aquestes noves tecnologies pot tenir el seu marc en determinats aliments que, bé pel seu alt valor afegit o bé per la impossibilitat de ser tractats tèrmicament sense provocar modificacions importants, trobin en aquestes tecnologies el seu mètode de tractament òptim (Felipe Cuyàs i col., 1994).

1.1.1. Tractaments de conservació amb aplicació de calor

La transmissió de calor als aliments líquids s'ha fet tradicionalment per convecció i conducció en un intercanviador de calor, o bé per injecció directa de vapor. La finalitat de la combinació d'aquests dos sistemes o la formació de calor dins l'aliment és reduir els canvis negatius que els tractaments tèrmics comporten als aliments i mantenir l'efecte higienitzant o esterilitzant requerit.

Ohmització

Aquest tipus de procés consisteix a fer passar corrent elèctric a través dels aliments. La resistència que provoquen els components de l'aliment al pas del corrent comporta un increment de tot el volum de la temperatura. L'escalfament per ohmització permet el tractament de líquids amb partícules que, en general, augmenten la temperatura més ràpidament que no el líquid alimentari (Fryer, 1995). Les aplicacions de l'escalfament òhmic en el processament d'aliments es remunten al 1917, però només en els darrers anys la indústria alimentària ha manifestat interès pel tema, especialment en el tractament d'aliments àcids (Larkin i Spinak, 1996).

Infusió altament calorífica

L'aparició de soques de microorganismes esporulats altament resistents al tractament UHT (*Ultra High Temperature*) indirecte tradicional i la limitació imposada per les directrius europees sobre el contingut màxim de lactulosa han provocat el desenvolupament d'un nou sistema de tractament UHT que aprofita l'economia dels tractaments UHT indirectes amb el nivell de lactulosa reduït que es produeix en tractaments UHT directes. El nou procés comença amb l'escalfament indirecte de la llet fins a 90 °C, en què es duu a terme una retenció per a establir les proteïnes. A continuació es refreda fins a 70 °C amb l'evaporació de part de l'aigua de la llet, seguidament s'escalfa de nou indirectament fins als 120 °C, i a partir d'aquesta temperatura la infusió de vapor dins una cambra especialment dissenyada, aconsegueix fer pujar la temperatura de la llet fins a 140-150 °C (figura 1). La refrigeració posterior es fa per intercanvi indirecte (Jensen, 1996). La infusió de vapor aconseguida mitjançant aquest tractament provoca menys desnaturalització de les proteïnes sèriques que la injecció de vapor tradicional (De Jong i col., 1994). Tanmateix aquest sistema pot ser utilitzat per a la producció de llet pasteuritzada (peroxidasa negativa), de llarga conservació (Fredsted i col., 1996; Kiesner i col., 1996).

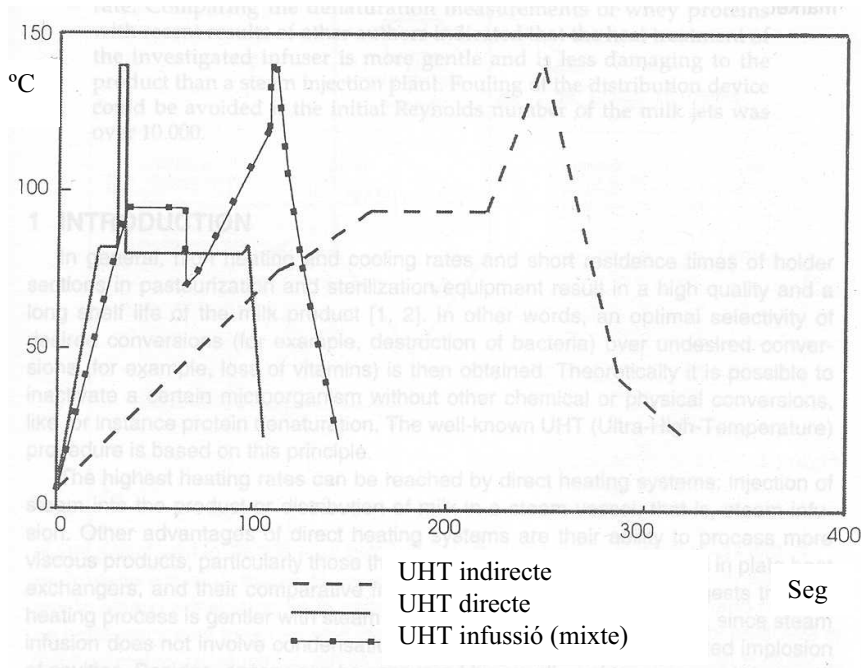


Figura 1: Corbes temperatura/temps dels tractaments UHT directe, indirecte i per infusió (Jensen, 1996).

Mano-temo-sonicació

L'aplicació d'ultrasons per a inactivar microorganismes es va començar a estudiar a partir dels anys vint i, de moment, la seva aplicació a la indústria alimentària es relaciona amb aspectes d'higiene industrial, la barreja i l'emulsió de líquids immiscibles, la reducció del temps de salament, la tenderització de la carn i la determinació de la composició d'aliments (Pascual i col., 1997a i b).

L'aplicació d'ultrasons provoca l'aparició d'ones sòniques que comprimeixen i expandeixen el líquid tractat amb una determinada freqüència. En determinades zones del líquid, aquesta compressió-expansió condueix a la cavitació, és a dir, a la formació de cavitats plenes de vapor. Durant la sonicació, aquestes petites bombolles van creixent fins a un cert límit, a partir del qual la bombolla es col·lapsa d'una manera molt violenta. Els canvis extrems de pressió produïts pel col·lapse de les bombolles són la principal causa de l'efecte letal sobre els microorganismes. En concret, s'atribueix al trencament mecànic de les membranes cel·lulars. De totes maneres, i encara que la sonicació ha estat proposada com a procés de pasteurització, la realitat és que els bacteris, i en especial les espores, són altament resistents fins i tot després d'hores de tractament. En aquest sentit, Sala i col. (1995) proposen la utilització combinada de temperatura (fins a 140 °C), pressió (fins 1 MPa) i ultrasons (fins a 340 W, 145 µm d'amplitud amb una freqüència de 20 KHz) com a tractament optimitzat respecte als ultrasons. Segons els mateixos autors, la combinació d'aquests tres paràmetres permet un notable increment d'efectivitat en la inactivació de microorganismes i enzims respecte a la utilització exclusiva de tractaments tèrmics.

Microones

Les microones formen part de l'espectre d'ones electromagnètiques amb una amplada de freqüència entre 300 MHz i 300 GHz. La freqüència més comuna en els fons de microones domèstics és de 2.450 MHz, encara que al Regne Unit utilitzen 896 MHz i als Estats Units 915 MHz. L'energia que aporten les microones es converteix en calor mitjançant mecanismes de canvis d'orientació de les molècules polars. Amb la freqüència de les microones, les molècules polars s'orienten cap a la font de microones o deixen d'orientar-se alternativament. Aquests canvis d'alineació provoquen l'alliberació d'energia cinètica que es manifesta en calor. És per això que la calor no necessita ser transportada a l'interior de l'aliment, sinó que es genera allà on es necessita. El mecanisme d'acció letal sobre els microorganismes es deu doncs a l'increment de temperatura del medi alimentari.

Les aplicacions de les microones estan relacionades principalment amb l'assecatge, la deshidratació i la descongelació d'aliments. És poc utilitzat en el camp de la sanització alimentària, tot i la constatació que el tractament per microones comporta respecte a la pasteurització una menor desnaturalització de la proteïna sèrica, una menor pèrdua de l'activitat dels enzims endògens de la llet i un lleuger increment de la letalitat microbiana (Villamiel i col., 1997). Les causes d'aquesta limitada utilització industrial estan associades a l'alt cost de les línies industrials de

microones i a l'escàs coneixement de les interaccions de les microones sobre l'aliment (Mullin, 1995).

1.1.2. Tractaments de conservació amb energies no calorífiques

L'aplicació de l'energia no calorífica al processament d'aliments està obrint camins nous i interessants amb l'objectiu de reduir els efectes indesitjables dels tractaments tèrmics sobre els aliments. Les tecnologies més estudiades són les següents:

Irradiació

La utilització de radiacions ionitzants en la conservació d'aliments apareix després de la Segona Guerra Mundial, a causa de l'interès de les principals organitzacions internacionals de demostrar l'ús positiu de l'energia nuclear en aquest camp. El tipus de radiació admès pel tractament d'aliments es produeix mitjançant dues classes de fonts: mecàniques o substàncies radioactives (Cobalt 60 i Cesi 137). Les fonts mecàniques depenen de l'energia elèctrica i es caracteritzen per l'alt grau de seguretat, ja que la radioactivitat desapareix en desconnectar l'equip. Les substàncies radioactives emeten radioactivitat d'una manera espontània i, per tant, contínua, però tenen l'avantatge que funcionen amb un cost energètic molt més baix. Aquestes fonts envien radiacions amb l'energia suficient per a trencar enllaços químics, provocar canvis en els components dels aliments i inactivar enzims i microorganismes.

La irradiació està limitada per l'aparició de canvis organolèptics en l'aliment tractat, els quals es redueixen parcialment irradiant en absència d'oxigen i a temperatures de congelació. El límit legal de la radiació que pot rebre l'aliment (10 KGy) és equivalent a la quantitat de calor necessària per a augmentar la temperatura de l'aigua 2,4 °C, i correspon al nivell màxim que garanteix l'absència de problemes toxicològics o nutricionals. Tampoc existeix perill d'aparició de radioactivitat induïda en aliments, si s'utilitzen les fonts de radiació autoritzades apropiadament.

A part de les limitacions tècniques i legals, la implantació d'aquesta tecnologia es veu afectada per la falta de confiança d'una part dels consumidors, que relacionen aquests tipus de tractament amb l'efecte nociu de les explosions nuclears (Sendra i col., 1996; Olson, 1998).

Microfiltració

La microfiltració es fa servir en aliments líquids i implica la utilització de membranes de porus suficientment petits (entre 0,1 i 10 μm) per a retenir els microorganismes. Segons Bindith i col., (1996), no provoca la desnaturalització de proteïnes o la inactivació d'enzims, però la seva eficàcia higienitzant és més limitada que la pasteurització HTST (*High Temperature Short Time*), i, per tant, no pot considerar-se un tractament sanitariament segur (Glaeser, 1996).

Un procés industrial de microfiltració patentat per Alfa Laval (Bactocach) utilitza la microfiltració per a concentrar bona part dels microorganismes i les espores en un 10 % del volum

de la llet desnatada processada, el qual es pasteuritzat juntament amb la nata a 130 °C durant 1-2 segons i barrejat posteriorment amb el permeat. Aquest procés permet allargar la vida útil de la llet fins a 14 dies sense alterar la condició de llet fresca no pasteuritzada (Bindith i col., 1996). També és possible utilitzar aquest tipus de tractament en combinació amb la pasteurització, que garanteix la inactivació de les formes vegetatives dels microorganismes patògens però no és efectiva amb els microorganismes termoresistents ni amb les espores (Larsen, 1996).

Polsos elèctrics d'alt voltatge

Aquest tractament consisteix en l'aplicació d'un camp elèctric d'alt voltatge (5-70 KV/cm) en un temps breu (μ s-ms) sobre un fluid alimentari, amb la intenció d'inactivar els microorganismes i enzims deterioradors de l'aliment. L'aplicació de camps elèctrics d'alt voltatge provoca en els aliments tres tipus de fenòmens: la generació de calor, la generació de radicals lliures i l'alteració dels potencials de membrana, que incrementen la permeabilitat i indueixen a la formació de porus en les membranes cel·lulars dels microorganismes (Sitzmann, 1995). Per altra banda, l'aplicació de polsos de baixa intensitat activa el metabolisme fúngic (Gillissen i Carlson, 1952). Els factors més importants que afecten la inactivació dels microorganismes es refereixen al tipus i estat fisiològic dels microorganismes, la composició química i resistència elèctrica del medi, i les condicions de procés del camp elèctric.

Les principals aplicacions d'aquest tractament són:

- Increment de la permeabilitat de teixits vegetals per augmentar la velocitat d'assecatament dels mateixos, per afavorir l'entrada de sucre o sals, o per l'extracció de metabolits cel·lulars (Dömenburg i Knorr, 1993; Knorr i col., 1994; Angersbach i Knorr, 1997; Barsotti i Cheftel, 1999).
- Conservació d'aliments líquids (sucs de taronja, llet, ou líquid, salses, etc...), amb utilització d'alts voltatges. Aquest tipus d'aplicació provoca una inactivació parcial d'enzims, encara que en determinats tractaments pot produir-se un efecte contrari (Barsotti i Cheftel, 1999). El gust i textura dels aliments es veuen menys afectats que en tractaments de pasteurització amb nivells d'inactivació microbiana similar (Quin i col., 1995).

Polsos lluminosos d'alta intensitat

L'aplicació d'un impuls lluminós d'una intensitat lumínica equivalent a vint mil vegades l'energia solar rebuda a nivell de mar pot ser utilitzada en la higienització d'aliments i superfícies. La longitud d'ona de la radiació se situa entre 200 i 1100 nm, amb un 25 % de radiació ultraviolada,

un 45 % de visible i un 30 % d'infraroig. La tecnologia està registrada amb el nom comercial de PureBright™ (Dunn i col., 1995).

L'efecte antimicrobià depèn de les característiques de l'aliment. En aliments transparents (aigua), el tractament provoca una reducció microbiana de més de 7 unitats logarítmiques, mentre que en aliments amb superfícies molt irregulars la reducció es limita a 1-3 unitats logarítmiques. El material d'embalatge o els aliments empaquetats són igualment susceptibles de ser tractats. Els polsos lluminosos inactiven formes vegetatives de bacteris, espores fúngiques o bacterianes, protozous, oòcits, virus, etc. segons s'ha deduït de les proves efectuades (Dunn, 1996). Aquesta tecnologia aconsegueix allargar la vida comercial de productes de panificació, marisc, cams, fruites, ous, sense afectar les característiques organolèptiques o nutritives (Dunn i col., 1995).

Ultra alta pressió d'homogenització

La utilització d'homogeneïtzadors d'ultra alta pressió està obrint la possibilitat d'higienitzar aliments líquids sense partícules en continu. Aquests equips poden arribar a aplicar 350 MPa mentre el líquid és cisellat al passar a través de les vàlvules d'homogeneïtzació, produint-se una considerable letalitat dels microorganismes. El procés d'homogeneïtzació provoca un augment de la temperatura del producte homogeneïtzat de aproximadament 1°C per cada 7 MPa de pressió aplicada. Encara que s'ha estudiat molt poc els efectes d'aquest tipus de tractament en els aliments (Elaamadi i col., 1996; Addapa i col., 1997), les possibilitats d'aplicació a la indústria alimentària són molt esperançadores.

1.1.3. Alta pressió isostàtica

El concepte *alta pressió* en el processament d'aliments es refereix a l'aplicació isostàtica de pressió, normalment entre 50 i 1000 MPa, a temperatures compreses entre -20 i 65 °C. La duració del tractament és molt variable: oscil·la des d'un minut fins a dies. La unitat de pressió més utilitzada és el pascal, que pertany al sistema internacional (1 MPa equival a 9,869 atmosferes o a 10 bars).

Les tecnologies d'alta pressió han estat majoritàriament aplicades a aspectes no alimentaris, com la producció de ceràmiques o d'acers. Tot i que Hite i col. comprovaren entre 1899 i 1914 que l'aplicació d'alta pressió millorava la conservació dels aliments (Mertens, 1993a), la tecnologia no va ser d'interès per a la indústria de l'alimentació fins que al setembre de 1989 vint-i-una companyies japoneses, amb el suport financer del Govern japonès, crearen l'Associació d'Investigació i Desenvolupament Japonesa per l'Alta Pressió a la Indústria Alimentària, amb la finalitat d'accelerar la implementació d'aquesta tecnologia a escala industrial. Fruit d'aquests esforços, l'empresa Meidi-Ya llançava al mercat, l'abril de 1990, la primera melmelada tractada amb alta pressió. Posteriorment, altres empreses van fer el mateix amb productes com iogurt i suc de fruites, pastissos d'arròs, salses per a amanides o salses de fruites (Cheftel, 1995).

A Europa, la recerca en alta pressió ha estat incentivada a partir de 1992 per diferents programes d'investigació finançats per la Unió Europea i per ajudes estatals dels propis membres. De moment, la seva aplicació comercial és més reduïda que al Japó, però existeix un interès molt alt entre les empreses per aquesta tecnologia i, alguns productes com el suc de taronja o el pemil cuit filetejat ja son tractats per aquest tipus de tractaments.

1.1.3.1. Equips de pressurització

Els equips que s'utilitzen a escala industrial i pilot son indirectes. La pressió es transmet mitjançant un líquid (normalment aigua), que transmet la pressió a l'aliment. Els equips de pressurització industrials poden ser de dos tipus: discontinus i semicontinus. En els primers, la mostra és posa dins el cilindre de pressió després de retirar una de les culates. Un cop introduït el producte, i abans de pressuritzar, s'ha de procedir al tancament de la culata. El sistema de tancament del cilindre és un punt crític: alguns equips d'investigadors han constatat l'aparició de fugues de líquid pressuritzador. Dins el cilindre, el producte no ocupa tot el volum del recipient sinó que el comparteix amb el líquid pressuritzador i, per tant, ha d'introduir-se envasat. Els envasos emprats en el tractament per alta pressió han de ser flexibles, o almenys, han de disposar d'una proporció de superfície flexible. Això es deu al fet que els aliments (rics en aigua) experimenten una reducció de la seva mida, proporcional a la pressió. L'existència d'aire dins l'envàs dificulta la pressurització a causa de l'elevada compressibilitat d'aquest aire. Els envasos plàstics multicapa o amb alumini no veuen afectades les seves propietats mecàniques o de barrera per la pressió. La migració de components de l'envàs a l'aliment tampoc es veu afavorida. El segellament tèrmic és l'opció més apropiada per a assegurar l'estanquitat dels envasos (Mertens, 1993b). Com que l'alta pressió es transmet isostàticament, la seva aplicació no depèn de la mida o de la forma de l'aliment (figura 2).

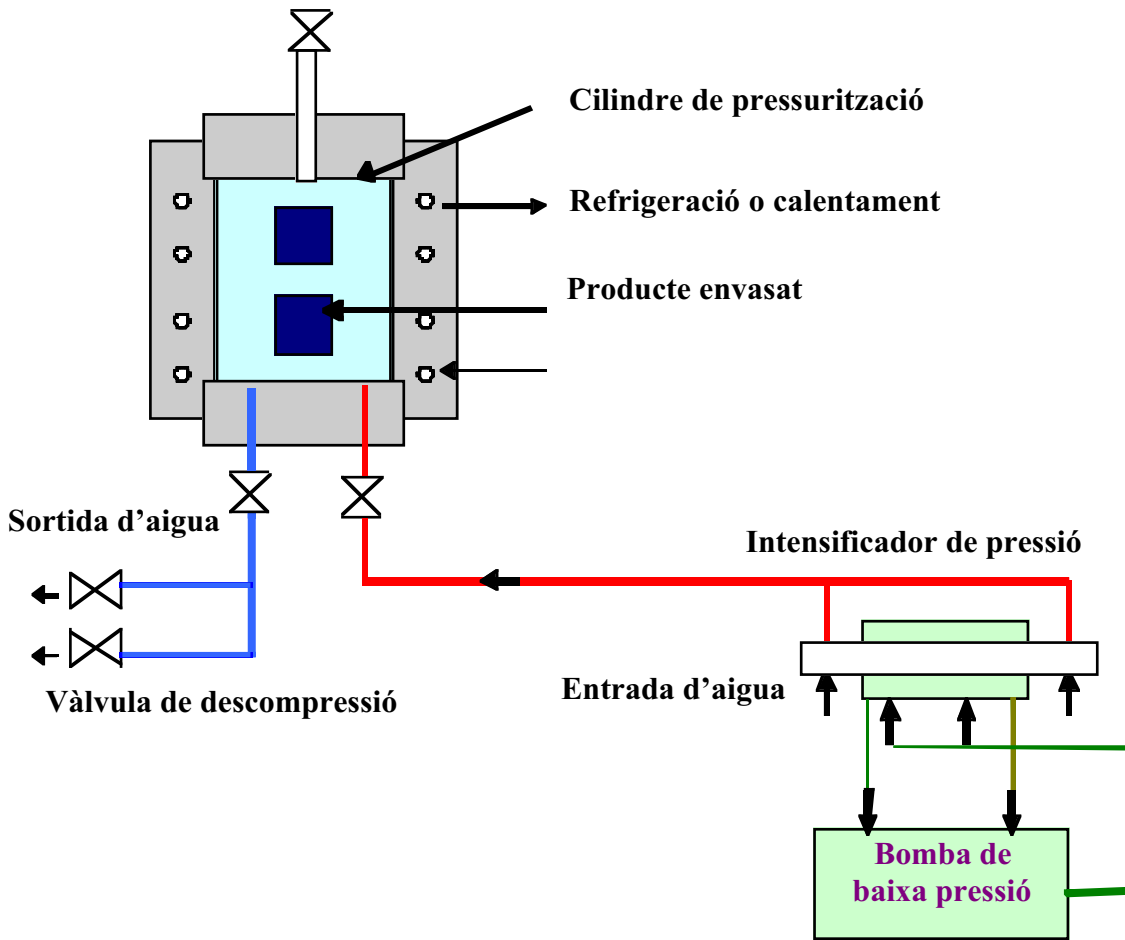


Figura 2. Esquema d'un equip d'alta pressió isostàtica

En els equips semicontinus, l'aliment és introduït dintre del cilindre mitjançant una bomba de baixa pressió. Una part mòbil del cilindre, semblant a un pistó, és l'encarregada de transmetre la pressió al fluid alimentari. Un cop acabat el tractament, una vàlvula de sortida permet l'evacuació del producte tractat. En aquest cas només podem tractar fluids i es necessita un sistema d'envasament asèptic a la sortida de la màquina, però té l'avantatge que el rendiment és superior al del sistema discontinu. La generació de pressió en equips pilots generalment és a càrrec de bombes pneumàtiques, que aprofiten l'energia de l'aire comprimit, mentre que en equips industrials les bombes són hidràuliques amb la utilització d'oli com a fluid transmissor. Les parts mòbils de les bombes pneumàtiques tendeixen a un desgast molt accelerat, cosa que les inhabilita per al seu ús a escala industrial.

L'energia necessària per a comprimir un determinat volum d'aigua pot calcular-se segons la fórmula següent:

$$e = 0,4 c P V_0$$

on c és la compressibilitat del medi, P és la pressió i V_0 és el volum inicial. Com que la compressibilitat de l'aigua és molt petita, l'energia necessària per a pressuritzar un determinat

volum també és petita. Per posar un exemple, un quilogram de vapor a 121 °C conté més energia que 100 litres d'aigua a 400 MPa (Mertens i Deplace, 1993). Aquest avantatge des del punt de vista energètic sobre els tractaments tèrmics també té el seu vessant favorable en la seguretat laboral, ja que la baixa energia acumulada dins l'equip comporta una disminució dels riscos de funcionament per als operaris (Mertens, 1995). Els equips d'alta pressió requereixen menys aigua que els intercanviadors de calor perquè no necessiten un període de pujada de temperatura fins que arriben al règim de treball ni un temps de refredament. L'absència de superfícies d'intercanvi tèrmic evita la deposició de proteïnes, greixos, sucres i sals càlciques a les parets de l'equip, amb la consegüent reducció de temps, aigua i productes de neteja necessaris per a la seva higienització.

1.1.3.2 Efecte de l'alta pressió en els components dels aliments

El comportament dels sistemes bioquímics afectats per la pressió segueix el principi de Le Chatelier, que postula que l'aplicació de pressió modifica l'equilibri d'un procés cap a l'estat que ocupi un volum menor i accelera els processos en què l'estat de transició presenta un volum menor que l'estat inicial. El canvi de volum d'una reacció o transició pot ser deduït de la constant d'equilibri en funció de la pressió, segons la fórmula següent:

$$(\delta \ln K / \delta P)_T = - (\Delta V / RT)$$

on ΔV és el canvi de volum (ml, mol⁻¹), K és la constant d'equilibri, P és la pressió (0,1 MPa \cong 1 atm), T és la temperatura (°kelvin) i R és la constant de gas (82 mL, atm, mol⁻¹, °kelvin⁻¹).

Aigua

L'aigua és el component majoritari de molts aliments, és el medi principal de reaccions i s'hi troben solubilitzats molts dels elements constitutius del mateix aliment. A diferència dels gasos la seva compressibilitat és molt baixa, però a alta pressió se'n redueix el volum aproximadament un 4 % cada 100 MPa.

Un fenomen observat en aquest tipus de tractament és l'augment del producte iònic de l'aigua en incrementar la pressió, així com la dissociació d'àcids i bases febles amb el consegüent descens de pH (Δ pH a 100 MPa i 25 °C = -0,73 unitats de pH). Aquests fets es relacionen amb l'electrostricció, que comporta una alineació molt més compacta de les molècules d'aigua quan aquestes interaccionen amb un grup carregat (veure figura 3). La compressió de l'aigua és un fenomen adiabàtic amb un increment de temperatura (2-3 °C per cada 100 MPa) i amb una recuperació posterior d'aquesta en la baixada de pressió.

<i>Pressió (MPa)</i>	<i>Compressibilitat (%)</i>		
	<i>0 °C</i>	<i>50 °C</i>	<i>95 °C</i>
<i>0,1</i>	0,0	0,0	0,0
<i>100</i>	4,3	3,7	3,9
<i>200</i>	7,5	6,7	7,1
<i>400</i>	12,1	11,1	11,6
<i>800</i>	-	16,9	17,5
<i>1000</i>	-	19	19,7

Taula 1. Compressibilitat de l'aigua pura a diferents temperatures i pressions (Tsiklis, 1968).

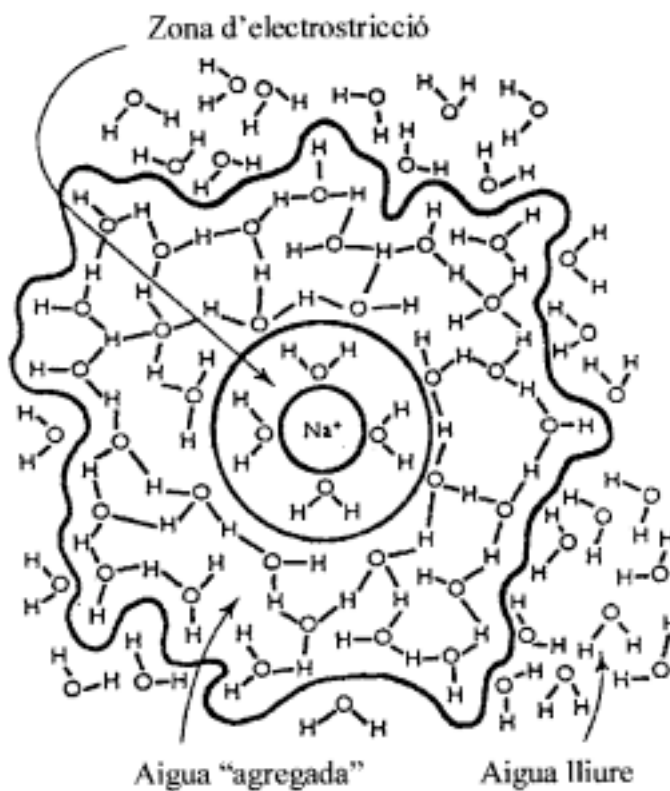


Figura 3: Dibuix del fenomen d'electrostricció (Van Kamp, 1996).

La transició de fase de l'aigua es veu afectada també per la pressió (figura 4). L'absència de cristalls de gel o la formació de diferents tipus de cristalls obre noves possibilitats en el processament d'aliments (Capellas, 1998): emmagatzematge sota pressió sense refredament (> 900 MPa); acceleració de la descongelació sota pressió (110-200 MPa); emmagatzematge a baixa temperatura (0 a -20 °C) sense formació de gel i congelació ultraràpida, per descompressió de mostres emmagatzemades a temperatures per sota de 0 °C amb pressió.

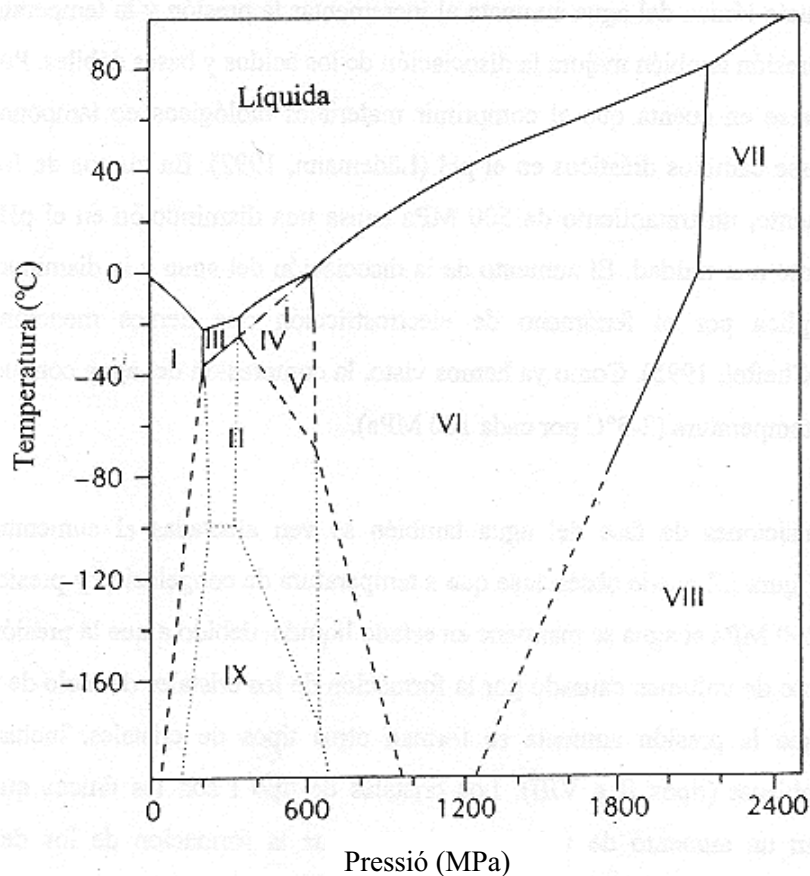


Figura 4. Transicions de fase de l'aigua sota pressió. I-IX Diferents estats de gel (Kalicevsky i col., 1995).

Proteïnes

Els efectes de l'alta pressió en les proteïnes estan lligats sobretot a modificacions de les interaccions intramoleculars d'origen no covalent. Aquest fenomen provoca canvis conformacionals que afavoreixen l'aparició de nous enllaços intramoleculars o intermoleculars. Les principals interaccions involucrades en l'estructura proteica són les següents (Mozhaev i col., 1994):

Van der Waals. Són interaccions que actuen entre els àtoms de les diferents proteïnes i la seva força està relacionada amb la distància entre àtoms. En comparació amb la resta d'interaccions són forces molt febles.

Forces hidrofòbiques. Apareixen a causa de la interacció desfavorable entre les molècules d'aigua i els residus no polars de les proteïnes. Això força la cadena proteica a replegar-se en forma de micel·la, amb els grups polars encarats cap a l'exterior aquós i els grups hidrofòbics orientats a l'interior de la proteïna. La pressió desestabilitza les interaccions entre grups alifàtics mentre que les interaccions entre anells aromàtics poden ser lleugerament afavorides.

Ponts d'hidrogen. Estan formats per un àtom electronegatiu amb, almenys, un doblet electrònic, i un àtom d'hidrogen lligat covalentment a un àtom electronegatiu. La seva formació o ruptura comporta canvis de volum molt petits i, per tant, són enllaços poc sensibles a la pressió.

Interaccions electrostàtiques. Apareixen entre grups ionitzats de cadenes laterals d'aminoàcids i dels carbonis o nitrògens de l'aminoàcid terminal de la cadena peptídica. La formació d'interaccions electrostàtiques comporta un increment de volum i, per tant, és inhibida per la pressió. Contràriament, la hidratació de grups carregats elèctricament està associada a una disminució de volum a causa del fenomen d'electrostricció.

Enllaços covalents. A les proteïnes s'inclouen com a enllaços peptídics i ponts disulfur (enllaços covalents entre residus de cisteïna). No se'n coneix la disrupció per tractaments d'alta pressió i poden ser la causa de l'alta estabilitat a la pressió observada en proteïnes amb un nombre elevat de ponts disulfur (p.e. seralbúmina bovina, Hayakawa i col., 1992).

L'alta pressió provoca una disrupció parcial dels enllaços febles esmentats. Al mateix temps es produeix un augment de la hidratació de grups apolars de la proteïna. Això és degut al fet que les molècules d'aigua s'alineen d'una manera molt compacta quan estan en contacte amb superfícies hidrofòbiques, amb la consegüent reducció de volum. Aquest fenomen promou la infiltració d'aigua en l'interior de la cadena polipeptídica i l'exposició a l'exterior de parts hidrofòbiques, provocant un augment de la hidrofobicitat de les proteïnes globulars. També apareixen canvis relacionats amb la reestructuració de l'aigua al voltant dels grups iònics. Aquests canvis poden ser reversibles o irreversibles. En molts casos, en produir-se la descompressió, l'exposició de parts hidrofòbiques de les cadenes polipeptídiques afavoreix la creació d'enllaços hidrofòbics amb altres proteïnes, originant-se un primer estadi d'agregació al qual segueix una estabilització per ponts disulfur. Aquest mecanisme de desnaturalització té un abast més reduït en el cas de proteïnes amb un gran nombre d'enllaços disulfur, ja que aquests

enllaços són estables a la pressió i ajuden a mantenir la conformació tridimensional de la proteïna (Balny i Masson, 1993; Gross i Jaenicke, 1994).

En el cas de les proteïnes formades per dues o més cadenes polipeptídiques, els canvis conformacionals provocats per la pressió ocasionen una dissociació dels components, que pot ser reversible o irreversible. Els monòmers resultants poden no ser capaços de formar de nou l'estructura inicial. En alguns casos romanen solubles, però poden agregar-se de forma irreversible pel mateix mecanisme que les proteïnes globulars (Balny i Masson, 1993).

Els canvis conformacionals no són tan sols funció de la pressió. Suzuki (1960) presentà diagrames pressió-temperatura per a la desnaturalització de l'ovalbúmina i la carbonilhemoglobina (la mesura de desnaturalització fou presa en funció de la proteïna romanent en la solució després del tractament i, per tant, ens indica la proteïna agregada). Les corbes tenen forma el·lipsoïdal i mostren que l'increment de temperatura del tractament no està associat a un augment lineal de la desnaturalització proteica.

La composició del medi (tampó o aliment) també influeix decisivament en la desnaturalització proteica. La presència de sals o sucres té un efecte protector sobre les proteïnes, probablement per la capacitat de lligar aigua que posseeixen aquestes substàncies. L'activitat enzimàtica es veu igualment influenciada per la pressió. En alguns casos pressions moderades multipliquen l'activitat de l'enzim però en altres la redueixen; per exemple, la termolisina incrementa la seva activitat unes quinze vegades quan se la sotmet a 100 MPa, mentre que la carboxipeptidasa A (també peptidasa amb un metall com a centre actiu) disminueix la seva activitat a un terç en les mateixes condicions (Kunugi, 1992). El mecanisme de modulació de l'activitat enzimàtica per part de la pressió no es coneix i, probablement, és degut a canvis en l'accessibilitat del substrat a la part activa de l'enzim i a canvis en el volum dels reactius-productes.

La pressió afecta la transició sol-gel proteica. Els gels estableixen la seva estructura tridimensional mitjançant ponts d'hidrogen entre les diferents cadenes. El procés de formació d'aquests enllaços és acompanyat de l'alliberació de molècules d'aigua que estaven lligades a la hidratació dels grups polars involucrats en els ponts. Aquest procés sol implicar un increment de volum i, per tant, l'aplicació de pressió comporta desplaçar la transició cap a la fase soluble (és el cas de les transicions sol-gel de l'ovalbúmina i de la proteïna de soja). La gelatina, però, té un comportament oposat (Mozhaev i col., 1994).

Hidrats de carboni

Generalment s'accepta que l'alta pressió no afecta els hidrats de carboni de baix pes molecular. En canvi, els equilibris sol-gel dels hidrats de carboni d'alt pes molecular sí que són modificats pels tractaments de pressurització de forma similar a les proteïnes. Per exemple, pels κ i ι -carragenats, la transició sol-gel està associada a un increment de volum. Els midons tractats per

alta pressió són més susceptibles a l'acció de l'amilasa durant la producció del sake (Miyama i col., 1992).

Lípids

El principal efecte dels tractaments d'alta pressió observat sobre els lípids és l'increment del punt de fusió, que passa de 10 a 15 °C per cada 100 MPa, i la seva cristal·lització (Cheftel, 1992; Buchheim i col., 1996). L'oxidació lipídica es veu potenciada pels tractaments d'alta pressió, tal com descriuen Cheah i Ledward (1996), i Angsupanich i Ledward (1998).

1.1.3.3. Efecte de l'alta pressió en els microorganismes

Les formes vegetatives dels microorganismes presenten una sensibilitat diferent als tractaments per alta pressió. En general s'admet que els bacteris Gram positius són més resistents que els gram negatius (Cheftel, 1995). En el cas de les formes esporulades, poden sobreviure a tractaments superiors a 1.000 MPa i per a inactivar-les cal combinar l'alta pressió amb temperatures superiors als 60 °C. Factors com el medi de tractament, la forma del microorganisme, la fase de creixement del microorganisme o la temperatura, el temps i la pressió del tractament són importants en els nivells d'inactivació dels microorganismes estudiats (Capellas, 1998).

1.2. LA LLET I ELS DERIVATS LÀCTICS

La llet es defineix com “el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostro, resultado del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras de mamíferos domésticos, sanas y bien alimentadas” (Código Alimentario Español, 1997).

<i>Tipus Llet</i>	<i>Estracte sec</i>	<i>Greix</i>	<i>Proteïna Total</i>	<i>Proteïna Caseínica</i>	<i>Proteïna Sèrica</i>	<i>Lactosa</i>	<i>Cendres</i>
<i>Vaca</i>	13	3,9	3,27	2,28-3,27	0,16-0,76	4,9	0,9
<i>Cabra</i>	12-17	3,7-7,4	3,11-3,91	2,14-3,18	0,37-0,7	-	0,75-0,95

Taula 2. Composició mitjana de la llet de vaca i de cabra de raça Murciano-Granadina (dades recopilades de Storry i col., 1983; Luquet, 1985; Martín-Hernández i col., 1988; Juárez i col., 1991).

Els components de la llet es distribueixen en tres fases: fase grassa, fase col·loïdal i fase soluble. La fase grassa està formada principalment per glòbuls de greix envoltats d'una membrana. En condicions naturals aquests glòbuls tendeixen a la coalescència a causa de la seva menor densitat i a la presència d'ancoratges proteics en la superfície que n'afavoreixen la unió. La fase grassa està majoritàriament formada per triglicèrids.

En les fases soluble i col·loïdal la resta de components es distribueixen en un complex equilibri, que és alterat fàcilment amb tractaments com la refrigeració, la pasteurització, l'acidificació o, com veurem en aquest treball, l'alta pressió.

Les proteïnes de la llet poden separar-se per precipitació isoelectrica en dos grans grups: caseïnes i proteïnes sèriques. Les caseïnes són fosfoproteïnes que en la llet desnatada precipiten a pH 4,6 a 20 °C; i es poden separar en α_{s1} -caseïna, β -caseïna, α_{s2} -caseïna, κ -caseïna. Les proteïnes solubles a pH 4,6 es corresponen a les proteïnes sèriques i inclouen la β -lactoglobulina, la α -lactalbúmina, la seralbúmina, la lactoferrina i les immunoglobulines. Altres compostos nitrogenats inclosos en la fracció soluble a pH 4,6 són les proteoses-peptones, corresponents a pèptids de degradació de les caseïnes i que es caracteritzen per l'estabilitat als tractaments tèrmics; i el nitrogen no proteic, que inclouen tots aquells compostos nitrogenats que no precipiten en presència d'àcid tricloracètic al 12 %.

1.2.1. Les caseïnes

Les caseïnes representen aproximadament el 80% de la proteïna làctica a la llet dels rumugants domèstics (vaca, cabra i ovella). En presència d'ions bivalents com el calci, les caseïnes tendeixen a associar-se en forma de micel·la, amb la participació d'enllaços de fosfat càlcic. Les característiques i propietats de cada tipus de caseïna es descriuen a continuació (Law, 1995a; Trujillo i col., 1997b):

α_{s1} -caseïna. El pes molecular d'aquesta proteïna en la llet de cabra és de 23.375 D amb 199 aminoàcids. La α_{s1} -caseïna caprina té sis variants genètiques (A, B, C, D, E i F), que presenten diferències en la cadena polipeptídica. Representa el 30 % de les caseïnes en la llet de vaca, però en la llet de cabra la proporció és més baixa i presenta una gran variabilitat a causa del seu polimorfisme genètic, amb al·lels genètics que es relacionen amb una producció alta, mitjana o baixa de proteïna. Així, els al·lels A, B i C proporcionen un nivell alt d'expressió (al voltant de 3,6 g/L), E porta a un nivell mitjà d'expressió (al voltant d'1,6 g/L), D i F porten a un nivell baix d'expressió (al voltant de 0,6 g/L), i finalment l'al·lel α_{s1} -Cn°, que comporta una absència de la α_{s1} -caseïna a la llet. Les variants D i F es caracteritzen per la seva menor càrrega negativa a causa de delecions de parts de la proteïna en el seu procés de síntesi. La baixa proporció de α_{s1} -caseïna associada a alguns al·lels i la diferència de càrregues negatives d'algunes variants genètiques tenen molta importància en

les característiques de la coagulació enzimàtica. Alts nivells de síntesi de α_{s1} -caseïna estan associats a una millora de les propietats de la coagulació i del rendiment formatger.

α_{s2} -caseïna. Va ser l'última caseïna que es va caracteritzar en la llet de vaca a causa de les seves diverses formes fosforilades. La proteïna de la llet de cabra té 208 aminoàcids i un pes molecular de 25.599 D.

β -caseïna. Juntament amb la α_{s1} -caseïna és una de les caseïnes majoritàries en la llet de vaca. En la llet de cabra la proporció de β -caseïna pot oscil·lar entre el 50 i el 70 % del total de caseïnes. La proteïna de la llet de cabra té un pes molecular de 23.741 D amb 207 aminoàcids. Es caracteritza per la seva forta hidrofobicitat, que provoca la seva dissociació de l'estructura micel·lar quan els enllaços hidrofòbics perden la força (per exemple en condicions de refrigeració). En la llet de cabra es reconeixen varies formes fosforilades de la β -caseïna. La β -caseïna és fàcilment proteolitzada per la plasmina.

κ -caseïna. La cadena polipeptídica de la κ -caseïna caprina conté 171 aminoàcids amb un pes molecular de 19.306 D. En la llet de vaca, la κ -caseïna té dues cisteïnes (els aminoàcids 11 i 88), que en permeten la polimerització mitjançant la formació de ponts disulfur intermoleculars. La κ -caseïna caprina té un residu de cisteïna extra en la posició 10. Aquest tercer grup -SH pot portar a un tipus de polimerització diferent de la que es dona en la κ -caseïna bovina. A més, la κ -caseïna caprina té un grup fosfat extra a la serina 168. La presència de grups carregats negativament en la superfície de la micel·la inhibeix la fase de la coagulació, explicant en part la baixa consistència de les quallades de llet de cabra. A diferència de la resta de caseïnes, el reduït nombre de residus fosfoseril (només dos a la κ -caseïna caprina), la fa molt poc sensible a la presència d'ions calci. Aquesta característica fa que tingui un paper molt important en l'estabilització de la micel·la. Quan interacciona amb la quimosina, l'enllaç Phe₁₀₅-Met₁₀₆ es trenca amb l'alliberament del caseinmacropèptid (pèptid amb els aminoàcids 106-169). Si les condicions de temperatura i força iònica són les adequades, aquest procés condueix a l'agregació de les micel·les i a la coagulació de la llet.

<i>Tipus Llet</i>	α_{s1} -caseïna	α_{s2} -caseïna	β -caseïna	κ -caseïna
<i>Vaca</i>	38,5	10	35,7	15,8
<i>Cabra</i>	4,4-26	5-25	42,2-64	9,8-23,5

Taula 3. Proporció de les diferents caseïnes en la llet de cabra i en la de vaca (dades recopilades de Cosseddu i Pisanu, 1979; Janess, 1982; i Law i Tziboula, 1992).

La major part de les caseïnes estan estructurades de forma micel·lar a 37 °C, amb associació de fosfat càlcic. Diferents models micel·lars han estat proposats per a explicar el comportament de les micel·les en tractaments com l'escalfament, el refredament, l'acidificació o la coagulació per renina (Waugh i Noble, 1965; Morr, 1967, i Walstra, 1990). El model més acceptat és el de Walstra, basat en una estructura formada per subunitats. Aquestes subunitats, anomenades submicel·les, contenen entre 15 i 25 caseïnes, amb un diàmetre d'entre 10 i 15 nm. Les submicel·les mantenen la seva unitat mitjançant enllaços hidrofòbics i ponts salins i formen la micel·la en unir-se entre elles per ponts de fosfat càlcic.

La κ -caseïna és ubicada principalment a l'exterior de la micel·la, amb la porció hidròfila del caseinmacropèptid encarada cap a l'exterior, en forma de filaments o 'cabells'. Aquests filaments formen una capa d'uns 7 nm de gruix i eviten l'agregació de les micel·les. En afegir-hi quimosina, els filaments són tallats i la micel·la es desestabilitza. Semblantment, l'etanol provoca la desestabilització micel·lar en col·lapsar aquests filaments. El diàmetre micel·lar ha estat determinat per microscòpia electrònica. Encara que la major part de les micel·les tenen menys de 20 nm, el diàmetre mitjà de les micel·les en la llet de vaca és de 120 nm (Walstra, 1990). La mesura obtinguda per dispersió lumínica estima un diàmetre mitjà superior al determinat per microscòpia electrònica. Existeixen variacions en el diàmetre micel·lar en funció dels individus i de l'estació de l'any. En fraccionar les micel·les segons el diàmetre per ultracentrifugació o cromatografia de permeació en gel, s'observa que la proporció relativa de les diferents caseïnes està relacionada amb el seu diàmetre. Micel·les més petites contenen una major proporció de κ -caseïna que micel·les més grans (5,7 % en micel·les de 298 nm de diàmetre i 12,9 % en micel·les de diàmetre 106 nm segons Dalgleish i col., 1989). L'increment de la proporció de κ -caseïna és compensat principalment per la reducció en β -caseïna. La proporció de α_{s2} -caseïna no varia en funció del diàmetre; segons el mateix estudi la α_{s1} -caseïna evoluciona de la mateixa manera que la α_{s2} -caseïna, mentre que Donnelly i col. (1984) observaren una reducció de la α_{s2} -caseïna en reduir-se el diàmetre micel·lar.

1.2.2. Les proteïnes sèriques

Les proteïnes sèriques es diferencien de les caseïnes pel fet que es mantenen en solució a pH 4,6 a 20 °C. A diferència d'aquestes, les proteïnes sèriques són riques en cisteïna, cosa que, mitjançant la formació de ponts disulfur, permet mantenir un alt grau d'estructura terciària. La seva conformació globular les fa menys sensibles a la proteòlisi que les caseïnes. Les principals proteïnes sèriques es detallen a continuació (Law, 1995a; Trujillo i col., 1997b):

β -lactoglobulina. És la proteïna sèrica més important des del punt de vista quantitatiu: representa entre un 60 i un 75% del total en la llet de cabra. Entre pH 5,0 i 8,0 a 20 °C la major part de la β -lactoglobulina està en forma de dímer, amb les dues molècules unides per forces electrostàtiques. La cadena polipeptídica conté cinc cisteïnes amb un pont disulfur intern entre els aminoàcids 66 i 160. Un segon pont disulfur pot aparèixer entre el residu

106 i el 119 o el 121, deixant un radical -SH lliure en un d'aquests darrers aminoàcids, el qual pot formar un pont disulfur intermolecular. El pes molecular de la β -lactoglobulina caprina és 18.191 D (monòmer), amb 162 aminoàcids.

α -lactalbúmina. És la segona proteïna sèrica en importància quantitativa en la llet de cabra (del 15 al 20% del total de proteïna sèrica). La cadena polipeptídica de la llet de cabra conté 123 aminoàcids amb un pes molecular de 14.194 D. Té vuit cisteïnes en la cadena que formen ponts disulfur i mantenen l'estructura globular de la proteïna.

Seralbúmina. És una proteïna present en la sang que aconsegueix travessar els teixits epitelials per incorporar-se a la llet. En la llet de vaca té 582 aminoàcids amb un pes molecular de 66.267 D. La proteïna és globular i conté disset ponts disulfur interns, deixant un radical sulfidril lliure en l'aminoàcid 34.

Immunoglobulines. Les immunoglobulines formen part del sistema immunitari i estan presents principalment a la sang i a la llet. En la llet de vaca s'han identificat quatre grups que tenen com a base una estructura formada per quatre cadenes: dues de lleugeres (amb un pes molecular de 25.000 D cadascuna) i dues de pesants (amb un pes molecular de 55.000 D cadascuna). Les immunoglobulines G tenen una estructura semblant a la descrita, les immunoglobulines A apareixen com a dímers i les immunoglobulines M són complexes, amb pesos moleculars al voltant d'1.000.000 D. Les immunoglobulines E (190.000 D) estan relacionades amb les reaccions al·lèrgiques.

Lactoferrina. És una glicoproteïna amb capacitat de lligar ferro. El seu pes molecular, incloent-hi els carbohidrats està estimat entre 83.000 i 87.000 D.

<i>Tipus Llet</i>	<i>β-lactoglobulina</i>	<i>α-lactalbúmina</i>	<i>Seralbúmina</i>	<i>Immunoglobulines</i>
<i>Vaca</i>	59-63,9	17,1-18,7	8,7-12,2	8,2-11,1
<i>Cabra</i>	39,2-72,1	17,8-33,3	5,1-8,15	4,6-21,4

Taula 4. Comparació entre les proporcions de proteïnes sèriques en la llet de vaca i en la de cabra (dades extretes de Law i col., 1993; Law i Brown, 1994; Law (1995b).

La fase soluble, composta majoritàriament per aigua, conté multitud de compostos en solució. Un d'aquests compostos, la lactosa, és el sucre majoritari de la llet, que quan és transformat pels microorganismes en àcid làctic, provoca una disminució de pH, característica pròpia de la fermentació làctica. També és necessari mencionar la presència de fosfat càlcic en forma de sal o en forma iònica, present en la fase soluble però que manté un complicat equilibri

amb la fase col·loïdal, de la qual se solubilitzen o a la qual s'incorporen depenent de factors com el pH, la temperatura o l'addició de quelants de calci.

1.2.3. Enzims endògens

Els enzims endògens de la llet, quantitativament poc rellevants però amb molta importància en el processament de la llet, mostren diferents nivells d'inactivació per a diferents tractaments tèrmics i són utilitzats com a indicadors del tractament tèrmic aplicat a la llet.

Fosfatasa alcalina. Enzim que trenca èsters d'àcid fosfòric. En la llet de vaca, la pasteurització a 72 °C durant 15 segons provoca la seva inactivació i, per tant, s'utilitza com a indicador d'una correcta higienització. En la llet de cabra, però, la menor activitat d'aquest enzim dificulta el seu ús com a indicador (Williams i col., 1991; Bivar Roseiro i Barbosa, 1995).

Lactoperoxidasa. La peroxidasa transfereix oxigen del peròxid d'hidrogen a altres substàncies fàcilment oxidables. L'enzim s'inactiva en escalfar-lo a 80 °C durant uns segons, i la determinació de la seva activitat permet conèixer si la llet s'ha sotmès a un tractament tèrmic per sobre d'aquestes condicions.

Plasmina. La plasmina és la proteasa més important de la llet. Aquest enzim intervé en un sistema complex compost per plasmina, plasminogen, inhibidor de la plasmina, activadors del plasminogen i inhibidors dels activadors del plasminogen. El seu principal substrat és la β -caseïna, la qual hidrolitza. Aquest enzim participa activament en la maduració del formatge ja que no és inactivat per la pasteurització (Alichanidis i col., 1986).

Lipasa. La lipasa trenca els triglicèrids en glicerol i àcids grassos lliures, que poden donar aromes rancies tant a la llet com als derivats làctics. Es troba lligada a la micel·la de caseïna i actua especialment quan la membrana del glòbul gras està alterada. La pasteurització a 78 °C durant 15 segons la inactiva.

1.3. LA LLET DE CABRA

1.3.1. La producció de llet

La producció de llet de cabra representa una part petita respecte al total de llet que es produeix a Catalunya, a Espanya, a Europa o al món. En els països en vies de desenvolupament, la cabra té un paper important en la nutrició humana a causa de la seva gran capacitat de viure i produir en condicions adverses per a altres rumugants. En canvi, en els països desenvolupats, el seu valor principal és l'aportació a la diversificació, l'originalitat i la qualitat dels productes làctics

que se'n deriven, aspectes importants en la societat de consum en què vivim (Le Jaouen i Kummann, 1995). Així mateix, i per a determinats grups humans, el consum de llet de cabra pot tenir avantatges sobre el de vaca, en especial per a les persones amb reaccions al·lèrgiques a les proteïnes de la llet de vaca. També s'ha esmentat en la literatura els avantatges del greix de la llet de cabra que es disposa en glòbuls de greix d'una mida més petita, la qual cosa en facilita la digestibilitat (Le Mens, 1991).

El destí principal de la llet de cabra és la producció de formatge. Les característiques dels diferents tipus de formatge depenen de la composició de la llet i del processament que se'n faci. Una petita proporció de la llet de cabra es destina a consum directe com a llet pasteuritzada, a la producció de iogurt (Robinson i Vlahopoulou, 1988) o a la producció de llet en pols (Jaubert i Schuck, 1996).

1.3.2. Característiques de la llet

En la llet de cabra es detecten glòbuls de greix d'un diàmetre més petit que els de la llet de vaca (un 65% tenen menys de 3 μm , comparat amb un 43% en la llet de vaca). Respecte a la mida micel·lar, Richardson i Creamer (1974) trobaren una gran diversitat en la mida de les micel·les utilitzant microscòpia electrònica de transmissió. Hi observaren que mentre que unes poques eren d'un diàmetre superior a 200 nm, la majoria era inferior a 80 nm. Pierre i col. (1995) mostraren que hi ha una distribució diferent del diàmetre de la micel·la en funció de la variant genètica respecte a α_{s1} -caseïna. La llet amb un alt contingut de α_{s1} -caseïna mostrava una distribució del diàmetre de les micel·les reduïda, al voltant de 80 nm. Contràriament, en les llets amb un baix contingut de α_{s1} -caseïna, el 70% del volum micel·lar eren micel·les d'un diàmetre superior a 130 nm. La proporció de calci i fosfat col·loïdal respecte a la caseïna col·loïdal és més gran en la llet de cabra que en la de vaca, com posaren de manifest O'Connor i Fox (1993), i Remeuf i col. (1989).

1.3.3. Efectes dels tractaments tecnològics en els components de la llet

En els darrers anys la millora de la seguretat higiènica dels productes alimentaris ha portat al tractament tèrmic de la llet de cabra, sobretot amb la finalitat d'eliminar els riscos de zoonosi provocats per *Brucella* spp., però també per altres microorganismes patògens per a l'home. El principal procés aplicat ha estat el tractament tèrmic, en condicions semblants a la llet de vaca, amb la suposició que l'efecte letal sobre els microorganismes patògens és similar a l'observat en estudis amb llet de vaca. S'han publicat pocs treballs sobre l'efecte del tipus de llet en la letalitat microbiana i en la desnaturalització proteica.

La llet de cabra és menys estable als tractaments tèrmics que la de vaca. Zadow i col. (1986) demostraren que el processament UHT de la llet de cabra amb pH per sota de 6,9 produïa la sedimentació de les caseïnes, i es feia necessari l'ús d'additius (polifosfats) o l'augment del pH de la llet a 7 o superior. El tractament UHT indirecte afecta menys

l'estabilitat que el directe (Montilla i Calvo, 1997), però fa necessària igualment l'addició de polifosfats (Kastanas i col., 1996). L'eliminació del fosfat càlcic de la llet de cabra té poca influència en l'estabilitat tèrmica i és necessari reduir la concentració de sals solubles fins a límits molt baixos abans d'apreciar algun efecte (Fox i Hoynes, 1976).

La influència que la pasteurització té sobre la velocitat de coagulació de la llet ha estat descrita d'una manera contradictòria en la literatura. Montilla i col. (1995) no trobaren diferències entre la llet crua i la pasteuritzada (65-85 °C durant 5-35 minuts). Contràriament, López i col. (1995) i Villamiel i col. (1997) sí que observaren increments en el temps de coagulació de la llet pasteuritzada. La femesa de la quallada disminueix en incrementar el tractament tèrmic aplicat (Bora i col., 1989; Villamiel i col., 1997).

Respecte a les interaccions proteiques provocades pels tractaments tèrmics, Wallander i col. (1967) notaren la desaparició d'una banda electrofòrica en el lactoserum àcid quan la llet era sotmesa a una temperatura superior a 73,9 °C, i encara desapareixia una altra banda per sobre de 85 °C. Pierre i col. (1977) estudiaren la pèrdua de solubilitat de les proteïnes làctiques caprines segons la disminució del nitrogen soluble i, uns quants anys més tard, Khandelwal i Gupta (1980) separaren les fraccions solubles per filtració en gel (Sephadex^R).

En els darrers anys, i associat a la millora de les tècniques analítiques de cromatografia, ha estat possible l'estudi de l'efecte dels tractaments tèrmics en cadascuna de les proteïnes sèriques. Montilla i col. (1995) estudiaren l'agregació de la a-lactalbúmina i la b-lactoglobulina en tractaments tèrmics fins a 80 °C durant 30 minuts i, posteriorment, Montilla i Calvo (1997) varen fer el mateix amb tractaments UHT (135-145 °C durant 20 segons). L'agregació de les proteïnes sèriques en escalfar xerigot també fou estudiat per Bajpai i Gupta (1979), que constataren un fort efecte estabilitzador de la caseïna en l'agregació de les proteïnes sèriques. Finalment, Hashimoto i Forti-Antunes (1992) estudiaren la desestabilització de la b-lactoglobulina en tampó tris-HCl a pH 6,8 sotmesa a tractaments de fins a 90 °C durant 30 minuts.

Altres tipus de tractaments estudiats per a higienitzar la llet de cabra han estat l'ús de microones i de microfiltració. En comparació amb l'ús d'un intercanviador de calor de plaques, les microones provoquen una menor desnaturalització de la b-lactoglobulina i una menor inactivació de la peroxidasa i la plasmina per a un mateix grau de destrucció microbiana (Villamiel i col., 1997). La microfiltració de la llet porta a la reducció d'estafilococs i de coliforms fecals, a un nivell semblant a la pasteurització (70 °C, 5 minuts) però amb un menor efecte desnaturalitzador de proteïnes. De totes maneres, també és associat a una menor acidificació de la quallada respecte a la obtinguda amb llet tractada tèrmicament o amb llet no tractada (Gay i col., 1993).

1.4. METODOLOGIA UTILITZADA EN L'ESTUDI DE LES PROTEÏNES LÀCTIQUES CAPRINES

A partir dels anys setanta, ha augmentat l'interès per la caracterització i quantificació de les proteïnes làctiques caprines. S'han desenvolupat mètodes separatius per a identificar els principals polimorfismes de les proteïnes làctiques (en especial per a κ , α_{s1} i α_{s2} -caseïnes), a causa de la relació entre aquests polimorfismes i la seva aptitud en la producció de formatge. La separació i quantificació de les proteïnes làctiques caprines ha permès avaluar les modificacions estructurals i associatives que els diferents tractaments higienitzants provoquen en les proteïnes. L'avaluació d'aquests canvis porta a un millor coneixement dels processos i, per tant, a la seva optimització.

Per a analitzar i quantificar les proteïnes làctiques, la llet s'acidifica a pH 4,6. En aquest pH, es produeix la precipitació isoelèctrica de les caseïnes i, junt amb elles, la de les proteïnes sèriques desnaturalitzades que hi ha a la llet. En el sobrenedant es mantenen principalment les proteïnes sèriques no desnaturalitzades. Algunes tècniques cromatogràfiques i electroforètiques ens permeten estudiar la fracció proteica insoluble a pH 4,6; altres tècniques ho fan amb la fracció soluble a pH 4,6 i, finalment, altres ens permeten estudiar les dues fraccions al mateix temps.

1.4.1. Fracció soluble a pH 4,6

La fracció soluble a pH 4,6 està formada, principalment, per proteïnes sèriques, encara que apareixen altres compostos no proteics. Dins d'aquest darrer grup es troben dues fraccions: la proteosa-peptona, que es defineix com la fracció que no precipita per ebullició prolongada de la llet, i el nitrogen no proteic (NNP), que inclou els compostos nitrogenats que no precipiten per addició d'àcid tricloracètic al 12%.

Les tècniques electroforètiques han estat durant molts anys la principal manera de separar les proteïnes sèriques. La tinció de les bandes obtingudes i la posterior quantificació per densitometria han estat satisfactòriament utilitzades (Carretero i col., 1992). Amb tot, certes limitacions com la variabilitat en l'absorció dels tints, la impossibilitat d'extreure del gel les fraccions obtingudes o la lentitud de l'anàlisi fan que aquests tipus de mètodes siguin substituïts per altres derivats de la cromatografia líquida en columna.

Amb el desenvolupament de sistemes de pressió mitjana (FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*) noves tècniques separatives han anat substituint l'ús de sistemes de baixa pressió (columnes Sephadex^R, Sephacryl^R i Sepharose^R). Hill i Kakuda (1990) utilitzaren una columna Superose connectada a un equip FPLC, i hi varen identificar dos pics, un format per β -lactoglobulina i l'altre per α -lactalbúmina, però amb poca capacitat resolutive. Posteriorment, Law

i Brown (1994) aconseguiren una millor separació de les proteïnes sèriques utilitzant una columna Superdex 75 HR 10/30. Aquesta columna formada per grànuls d'agarosa lligats amb dextrà permet separar i quantificar quatre fraccions d'alta puresa (immunoglobulines, seralbúmina/lactoferrina, β -lactoglobulina i α -lactalbúmina). La segona fracció està formada per una barreja de seralbúmina i lactoferrina a causa de la seva similitud en pes molecular.

La utilització d'equips cromatogràfics d'alta pressió (HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*) també permet separar les proteïnes sèriques. De Frutos i col. (1992) aconseguiren separar dues fraccions emprant una columna VYDAC 214 TPB 10, amb C4 com a fase estacionària. Aquest tipus de tècniques tenen l'avantatge que són ràpides i que la utilització de solvents orgànics volàtils permet obtenir fàcilment fraccions pures de proteïna. Al mateix temps, aquests autors observaren que la separació de α -lactalbúmina i seralbúmina era molt imperfecta i que la quantificació es veia compromesa pel fet que les columnes absorbien irreversiblement part de la proteïna injectada.

En el segon article presentat es descriu un mètode preparatiu per a l'obtenció de proteïnes sèriques de llet de vaca, cabra i ovella amb un elevat estat de puresa. La consecució de fraccions pures permetrà un millor estudi sobre les mateixes proteïnes, i les interaccions amb altres compostos, quan són sotmeses a tractaments físics i químics.

No existeixen referències bibliogràfiques sobre mètodes preparatius cromatogràfics de separació de proteïnes sèriques, a excepció d'Armstrong i col. (1970) que proposaren l'ús de la columna Sephadex^R G-75 o G-100 amb un sistema de baixa pressió, i de Manji i col. (1985), que utilitzant un sistema d'intercanvi iònic (columna Mono Q amb FPLC), separen el lactoserum àcid de la llet de vaca en quatre fraccions (immunoglobulines, seralbúmina/lactoferrina, β -lactoglobulina i α -lactalbúmina). Aquesta última tècnica permet separar les variants A i B de la β -lactoglobulina bovina i és d'una gran utilitat com a mètode preparatiu per a l'obtenció d'aquestes proteïnes.

1.4.2. Fracció insoluble a pH 4,6

La caracterització de la fracció insoluble a pH 4,6 de la llet de cabra ha estat objecte de més estudis que la fracció soluble, per la seva major rellevància en l'optimització de la producció lletera caprina. En totes les tècniques disponibles (electroforesi, cromatografia en columna de baixa, mitjana i alta pressió), els agents disruptors de les interaccions proteïna-proteïna són essencials per a separar les caseïnes. Alkaline o Acid PAGE (gel de poliacrilamida amb pH àcid o bàsic), SDS-PAGE (gel de poliacrilamida amb *sodium dodecyl sulphate*), PAAGE (gel de poliacrilamida-agarosa), SUGE (gel de midó-urea) i electroforesi bidimensional han estat utilitzats per diferents autors (Grosclaude i col., 1987; Addeo i Mauriello, 1988; Dall'Olio i col., 1988), per a separar les diferents variants genètiques de les caseïnes en funció de la seva mobilitat electroforètica.

De totes maneres, la utilització de tècniques cromatogràfiques en columna ha anat guanyant terreny en els darrers anys. D'una banda, l'ús de columnes de fase reversa en HPLC i, de l'altra, la millora de les columnes d'intercanvi iònic en FPLC (Mono Q i Mono S en comptes de Sepharosa^R) fan possible el processament d'un gran nombre de mostres en un temps reduït. Law i Tziboula (1992) utilitzaren una columna Mono S (intercanvi catiònic) en FPLC per a separar les caseïnes caprines en cinc fraccions (proteosa-peptones, b, κ , a_{s1} , a_{s2}), en una sola anàlisi. La tècnica permet aïllar i quantificar d'una manera ràpida i automàtica les caseïnes caprines i les variants genètiques A i B de la κ -caseïna (Law i Tziboula, 1993).

Per contra, la utilització de columnes d'intercanvi aniònic (Mono Q) no permet la separació completa de les fraccions b- a_{s1} - a_{s2} (Law i Tziboula, 1993). En la llet de vaca, ambdues fraccions han estat emprades per a examinar la desfosforilació i la pèrdua de grups amino de les caseïnes com a conseqüència de tractaments tèrmics d'esterilització (Law i col., 1994b).

Diferents tècniques de separació per fase reversa en HPLC de les caseïnes caprines també han avançat considerablement en els darrers anys. Mikkelsen i col. (1987) separaren les quatre principals fraccions caseíniques utilitzant una columna RP-8. Mora-Gutiérrez i col. (1991) feren servir una columna en fase estacionària C4 per a separar i quantificar la a_{s1} -caseïna de llet de cabres de races francesa-alpina i anglo-nubian. També amb una columna C4, Jaubert i Martín (1992) separaren les diferents caseïnes amb els seus corresponents polimorfismes. En aquest cas, també es provà una columna C18, i s'obtingué una separació equivalent a la de la C4 però amb l'inconvenient que part de la b-caseïna injectada és retinguda a la columna.

1.4.3. Determinació conjunta de la fracció soluble i insoluble a pH 4,6

Les tècniques que possibiliten la separació i quantificació de totes les proteïnes làctiques en una sola anàlisi cromatogràfica són de desenvolupament recent. Aquest és el cas de la tècnica de Visser i col. (1991), que amb una columna C18 aconseguiren separar les caseïnes i les principals proteïnes sèriques (α -lactalbúmina i β -lactoglobulina) de la llet de vaca. De totes maneres, la quantificació de les proteïnes sèriques no queda ben resolta. En el tercer article presentat, una variació d'aquesta tècnica permet separar les principals proteïnes làctiques en una sola anàlisi.

També cal fer esment en aquest apartat de metodologia analítica de les tècniques d'electroforesi capil·lar, que permeten analitzar les caseïnes i les proteïnes sèriques en una sola anàlisi, de forma automàtica i amb una preparació molt senzilla de la mostra (Recio i col., 1997).

2. OBJECTIUS GENERALS

El tractament de la llet per alta pressió s'estudia en l'actualitat com a alternativa a la pasteurització, per a higienitzar la llet destinada a la producció de formatges d'alta qualitat. Entre els diferents tipus de formatges, els elaborats amb llet de cabra tenen un valor afegit respecte de la resta, en especial dels obtinguts amb llet de vaca. Això vol dir que els consumidors estan disposats a pagar un preu extra per a millorar-ne la qualitat i, per tant, que podrien assumir un increment de cost derivat de la utilització de l'alta pressió en substitució de la tradicional pasteurització.

A hores d'ara, l'efecte dels tractaments per alta pressió en les proteïnes i en les micel·les de caseïna ha estat poc estudiat. Per aquest motiu, un millor estudi de les proteïnes i estructures proteiques sotmeses a alta pressió permetrà conèixer els mecanismes que actuen en les modificacions de la llet i de la seva funcionalitat per a la coagulació àcida i enzimàtica (Martínez-Cuevas, 1998; López-Fandiño i Olano, 1998, Trujillo i col., 1999) i, per tant, pot ser utilitzat en l'optimització dels tractaments que cal aplicar a cada tipus de derivat làctic.

Així doncs, els aspectes a investigar en aquest treball, pel que fa als tractaments tèrmics i a l'alta pressió, són els següents:

- La proporció de proteïna irreversiblement desnaturalitzada per a cadascuna de les principals proteïnes sèriques per a pressions de fins a 500 MPa i temperatures de fins a 50 °C, i per efecte de la pasteurització fins a 90 °C.
- Els patrons d'agregació de les diferents proteïnes sèriques, per a les diferents pressions i temperatures estudiades. Així mateix, l'estudi de la possible interacció entre proteïnes sèriques i caseïnes arran dels tractaments.
- Les modificacions en la forma i composició proteica de la micel·la de caseïna provocades pels diferents tractaments estudiats. Així mateix s'estudiarà la influència de la temperatura i de les concentracions de calci i fòsfor soluble en els canvis esmentats.

Un altre aspecte interessant ha estat el desenvolupament d'indicadors per a avaluar d'una manera objectiva la intensitat del tractament que s'ha fet a la llet.

