



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**ESTUDIO DE LOS TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN  
HIDROSTÁTICA EN LA LECHE DE OVEJA**

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

**RAMÓN GERVILLA FERNÁNDEZ  
Bellaterra, 2001**



## **C. E. R. PLANTA DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS**



DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS

## **ESTUDIO DE LOS TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA EN LA LECHE DE OVEJA**

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

RAMÓN GERVILLA FERNÁNDEZ  
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2001

BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, Catedrático de Tecnología de los Alimentos, y  
VICTORIA FERRAGUT PÉREZ, Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos de la  
Universitat Autònoma de Barcelona,

HACEN CONSTAR: Que el licenciado en Veterinaria Ramón Gervilla Fernández ha  
realizado, bajo su dirección, en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat  
Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado “Estudio de los tratamientos por alta presión  
hidrostática en la leche de oveja” que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés),  
el 8 de Marzo del 2001.

Buenaventura Guamis López

Victoria Ferragut Pérez

*“La constancia es la virtud por la que todas las cosas dan su fruto”*

(Arturo Graf)

Quiero dedicar este trabajo a mi familia: a mis padres, hermano, hermanas, cuñados, cuñadas, sobrinos, sobrina y en especial a quien ha soportado con tanta paciencia y cariño las neuras de este oficio y por estar siempre a mi lado, a mi mujer, Gabi. Y por último y no menos importante, a quien ha puesto fecha límite a mi tesis, mi hijo, Guillem.

## AGRADECIMIENTOS:

Con estas palabras quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado a avanzar por el largo camino que ha recorrido esta tesis, y en especial:

A Buenaventura Guamis, en primer lugar por acogerme en la Unidad de Tecnología de los Alimentos, velar por la financiación económica del estudio y personal. Por sus ideas, dirección, paciencia, confianza en mí, apoyo moral, ...y por tantos otros motivos de los que resalto nuestra amistad.

A Victoria Ferragut, por la visión práctica, realista y profesional que ha sabido enseñarme de tantas cosas que rodean a este mundo científico. Por su dirección, paciencia y amistad.

A Xavier Felipe, Marta Capellas, Toni Trujillo, Esther Sendra y Joan Miquel Quevedo, porque desde el comienzo de mi trabajo han sido decisivos e imprescindibles, por su disponibilidad, infinita paciencia, tertulias y por mucho más.

A Eduard Ponce, Josep Yuste, Marta Pavía, Mireia Roca, Xavi Lodos, Manel Martínez, Ferran Pratginestòs, Martín Buffa, Lamya Daoudi, Jordi Saldo, Cristina Royo, Elena Beltrán, Israte Normahomed, Vanessa Martínez, Sònia Llorens, Laia Urdi y tantos otros y otras que temo olvidar y que unos más que otros o de una forma u otra han aportado su desinteresada ayuda y han permitido que todo este tiempo haya sido de lo más agradable en esta gran familia.

A Montse Mor-Mur, Reyes Pla y Carmen Carretero, por su ayuda y consejos a nivel profesional y sobre todo por los buenos momentos a nivel personal.

A Pilar Pérez, por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por su confianza, amistad y apoyo, pero sobre todo por estar siempre ahí.

A Laura Nicolás, gracias a ella hay orden en la Unidad y la burocracia se nos hace más llevadera. Por los buenos momentos y su amistad.

A Ángel Sanjuan y Teresa Salvadó, por hacer todo más fácil y llevadero en la planta piloto, por su continuo apoyo, tertulias y amistad.

A Pedro Puig, Miguel Martín, Albert Teixidó y José María Piquer, por su colaboración en el estudio estadístico de los resultados.

A Alex González, Nuria Herrán, Germán Guerrero e Isabel Lorente, por las experiencias vividas todos estos años, por su amistad, apoyo, las penas y alegrías compartidas, por el "*Club del Berrichón, que aún (rema-rema)<sup>5</sup> el marinero*", por todo y por siempre.

A Ferran Riva, por su disponibilidad y profesionalidad a la hora de proporcionarme la leche de oveja.

A la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), por el suministro de las cepas bacterianas de una forma tan rápida y eficaz.

Al Sr. Antoni Curieses de INMASA, por sus consejos profesionales y personales, amistad y ayuda en la puesta en marcha y problemas con el equipo de alta presión.

Al personal del Servicio de Microscopía de la UAB, y en especial a la Sra. Mercè Gaudes, por su inestimable y desinteresada ayuda al realizar e interpretar los análisis de microscopía CLSM.

Este trabajo se ha realizado con financiación aportada por:

- La Unión Europea, a través de los proyectos de investigación AIR1-CT92 y FAIR-CT96-1113.
- El Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments de la Generalitat de Catalunya (CeRTA).

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. LA LECHE .....	3
1.2. LA LECHE DE OVEJA .....	3
1.2.1. Propiedades fisicoquímicas .....	6
1.2.2. Composición .....	7
1.2.3. Aptitud quesera .....	10
1.2.4. Aspectos microbiológicos .....	10
1.2.5. Control de calidad y sistema de pago .....	10
1.3. MODIFICACIONES EN LECHE POST-RECOGIDA (REFRIGERACIÓN) .....	11
1.3.1. Modificaciones fisicoquímicas .....	11
1.3.2. Modificaciones bioquímicas .....	12
1.3.3. Modificaciones microbiológicas .....	13
1.4. LA GRASA LÁCTEA Y EL GLÓBULO GRASO .....	13
1.4.1. Lipólisis espontánea .....	14
1.4.2. Lipólisis inducida .....	15
1.4.3. Lipólisis microbiana .....	15
1.5. MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA LECHE .....	16
1.6. TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN DE LA LECHE .....	18
1.6.1. Tratamientos térmicos .....	18
1.6.2. Nuevas tecnologías .....	20
1.6.2.1. Tratamientos con efecto térmico .....	20
1.6.2.2. Tratamientos sin efecto térmico .....	21
1.7. LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS .....	22
1.7.1. Efecto sobre los componentes de los alimentos .....	23
1.7.2. Efecto sobre la microbiota .....	29
1.7.3. Tecnología y equipos .....	33
1.7.4. Antecedentes en leche y productos lácteos .....	34
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>39</b>

<b>3. PUBLICACIONES</b>	<b>45</b>
3.1. Effect of High Hydrostatic Pressure on <i>Listeria innocua</i> 910 CECT Inoculated into Ewe's Milk. (Gervilla y col., 1997). <i>Journal of Food Protection</i> , <b>60</b> :33-37.	47
3.2. Effect of High Hidrostatic Pressure on <i>Escherichia coli</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> Strains in Ovine Milk. (Gervilla y col., 1997). <i>Journal of Dairy Science</i> , <b>80</b> : 2297-2303.	55
3.3. Kinetics of Destruction of <i>Escherichia coli</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> Inoculated in Ewe's Milk by High Hydrostatic Pressure. (Gervilla y col., 1999). <i>Food Microbiology</i> , <b>16</b> : 173-184.	65
3.4. Sensitivity of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Lactobacillus helveticus</i> in Ovine Milk Subjected to High Hydrostatic Pressure. (Gervilla y col., 1999). <i>Journal of Dairy Science</i> , <b>82</b> : 1099-1107.	79
3.5. High Pressure Inactivation of Microorganisms Inoculated into Ovine Milk of Different Fat Contents. (Gervilla y col., 2000). <i>Journal of Dairy Science</i> , <b>83</b> : 674-682.	91
3.6. High Hydrostatic Pressure Effects on Color and Milk Fat Globule of Ewe's Milk. (Gervilla y col., 2001). <i>Journal of Food Science</i> . (Aceptada, en prensa).	103
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
4.1. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	135
4.2. ASPECTOS FISICOQUÍMICOS	142
4.2.1. Tamaño y distribución de los glóbulos grasos	142
4.2.2. Evaluación de la lipólisis	144
4.2.3. Evaluación del color	145
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>147</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>
<b>7. ANEXO I</b>	<b>165</b>
<b>8. ANEXO II</b>	<b>175</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción de leche de vaca, oveja y cabra en 1998 .....	5
<b>Tabla 2.</b> Evolución de la producción de leche de vaca, oveja y cabra en España.....	6
<b>Tabla 3.</b> Evolución de la producción de quesos con leche de vaca, oveja y cabra en España .....	6
<b>Tabla 4.</b> Propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca y oveja .....	6
<b>Tabla 5.</b> Composición media de la leche de vaca y oveja.....	8
<b>Tabla 6.</b> Proporción de las diferentes proteínas en la leche de vaca y oveja .....	8
<b>Tabla 7.</b> Proporción de las diferentes sales minerales en la leche de vaca y oveja.....	9
<b>Tabla 8.</b> Proporción de las diferentes vitaminas en la leche de vaca y oveja .....	9
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos térmicos más utilizados en las industrias lácteas .....	19
<b>Tabla 10.</b> Compresibilidad del agua pura a diferentes presiones y temperaturas .....	25
<b>Tabla 11.</b> Niveles de significación para la variable “presión” en los microorganismos estudiados .....	170
<b>Tabla 12.</b> Niveles de significación para la variable “temperatura” en los microorganismos estudiados .....	170
<b>Tabla 13.</b> Niveles de significación para la variable “tiempo” en los microorganismos estudiados .....	170
<b>Tabla 14.</b> Niveles de significación para la variable “composición del medio” en los microorganismos estudiados .....	171
<b>Tabla 15.</b> Valores <i>F</i> en los microorganismos estudiados .....	171
<b>Tabla 16.</b> Composición media de la leche de oveja utilizada en este estudio .....	171
<b>Tabla 17.</b> Tiempos de reducción decimal (Valores <i>D</i> ) a diferentes presiones y temperaturas en los microorganismos estudiados .....	172
<b>Tabla 18.</b> Niveles de significación de las variables analizadas en los parámetros fisicoquímicos estudiados .....	173
<b>Tabla 19.</b> Valores <i>F</i> en los parámetros fisicoquímicos estudiados .....	173
<b>Tabla 20.</b> Microorganismos, medios de cultivo, temperaturas y tiempos utilizados en los ensayos microbiológicos .....	178

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Transiciones de fase del agua bajo presión. Diferentes estados de hielo I-IX (Kalichevsky y col., 1995) .....	24
<b>Figura 2.</b> Esquema del equipo de alta presión instalado en la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos, Universitat Autònoma de Barcelona (por cortesía de ACB-GEC ALSTHOM, Nantes, Francia) .....	37
<b>Figura 3.</b> Plan de trabajo en los ensayos microbiológicos .....	42
<b>Figura 4.</b> Plan de trabajo en los ensayos fisicoquímicos .....	43
<b>Figura 5.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 2 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada .....	140
<b>Figura 6.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 10 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada .....	140
<b>Figura 7.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 25 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada .....	141
<b>Figura 8.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 50 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada .....	141
<b>Figura 9.</b> Tendencias sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a diferentes presiones durante 15 min. como función de la temperatura del tratamiento .....	167
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de supervivencia para <i>L. innocua</i> (400 MPa / 25 °C) (●) y <i>L. helveticus</i> (450 MPa / 25 °C) (▲) en períodos prolongados de tratamiento por altas presiones. Cinéticas de destrucción microbiana .....	167
<b>Figura 11.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 25 °C y diferentes presiones como función del tiempo aplicado del tratamiento .....	168
<b>Figura 12.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 2 °C y diferentes presiones como función del tiempo aplicado del tratamiento .....	168

<b>Figura 13.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados a 4 °C con diferentes presiones durante 15 min. como función de la composición del medio donde se aplicó el tratamiento .....	169
<b>Figura 14.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados a 25 °C con diferentes presiones durante 15 min. como función de la composición del medio donde se aplicó el tratamiento .....	169
<b>Figura 15.</b> Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados a 50 °C con diferentes presiones durante 15 min. como función de la composición del medio donde se aplicó el tratamiento .....	169

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1.- LA LECHE

Desde el punto de vista legal, la leche se define como “el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas”. Con la denominación genérica de “leche” se comprende única y exclusivamente la leche natural de vacas. Las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se designarán indicando además el nombre de la especie correspondiente (Código Alimentario Español, 1997).

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche presenta gran complejidad, pudiéndose definir como un sistema heterogéneo formado por diferentes fases en equilibrio inestable.

La fase mayoritaria, acuosa, contiene moléculas (como la lactosa) e iones (como el  $\text{Ca}^{2+}$ ) disueltos. Los coloides dispersos en la fase continua están constituidos por las proteínas séricas, los complejos micelares de caseína y la grasa en forma de glóbulos. El compuesto salino  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ , asociado a un complejo orgánico de caseinato de calcio, es un coloide muy sensible a los cambios fisicoquímicos de la leche. La micela fosfocálcica es un agregado macromolecular de forma y masa variable que en la leche fresca está cargada negativamente, favoreciendo la repulsión electrostática resultante entre las micelas y asegurando la estabilidad del sistema disperso. Los glóbulos grasos se hallan como gotas en forma de emulsión o/w, hallándose rodeadas de una membrana lipoproteica que favorece la estabilidad en el medio continuo. Si esta membrana se altera eléctrica o biológicamente, se producirá una desestabilización irreversible. Por otra parte, los microorganismos de la leche, esencialmente bacterias, están en suspensión estable. Su desarrollo eventual puede dar lugar a inestabilidad, la mayoría de las veces por acidificación, como es el caso de las bacterias lácticas y, llegado el caso, pero en último término, por proteólisis, como es el caso de las bacterias psicrótrofas.

## 1.2.- LA LECHE DE OVEJA

Resulta difícil remontarse a los orígenes exactos de la utilización del ganado ovino. Se sabe no obstante, que el rebaño de ovejas ha acompañado el desarrollo de la civilización en el Mediterráneo, zona poco favorable para la producción de leche de vaca.

España, por tradición, ocupa un lugar destacado en la explotación del ganado ovino. Su posición geográfica junto con la climatología, determina una producción herbácea pastable escasa, estacional, y a veces de baja calidad, que sólo el ganado ovino y caprino es capaz de

rentabilizar. Si a ello unimos las frecuentes zonas de montaña con grandes pendientes, resulta que el aprovechamiento económico de los pastos de más de los dos tercios del territorio nacional no tienen otra alternativa que la explotación del ganado ovino y caprino.

Entre las razas ovinas que participan mayoritariamente en la producción de leche en España hay que destacar la Churra, Manchega, Lacha y Castellana, aunque con frecuencia se ordeñan ovejas de otras razas.

La producción lechera española presenta una gran estacionalidad. Esto es debido al carácter cíclico de la disponibilidad de los alimentos, a las condiciones climáticas que afectan a la alimentación, a las condiciones del mantenimiento de la leche hasta su recogida y a factores económicos, especialmente la cotización del sector cárnico, sobre todo del cordero lechal (Rouco y Calahorra, 1993). Con la intensificación de las explotaciones esta estacionalidad tendería a desaparecer, pero no es previsible que desaparezcan dada la deficiente estructura productiva con que se cuenta y el gran número de explotaciones familiares. Sería pues, necesario, un gran esfuerzo para alcanzar objetivos de calidad, tipificación y homogeneidad en las producciones. La mejora genética de las razas, una alimentación y un manejo más adecuados, así como, un especial cuidado en la obtención, conservación y distribución de la leche incidiría directamente en la revalorización de los productos derivados.

La situación socioeconómica y el aumento de calidad de vida han hecho que se incremente la demanda de productos derivados de la leche de oveja, cuya evolución dependerá de su capacidad para competir con los derivados de leche de vaca. Si bien potencialmente el mercado es grande, el sector debe superar la mala fama de los quesos frescos y artesanales de oveja por asociación con riesgos de toxiinfecciones. La leche de oveja es poco apreciada para su consumo directo pero en cambio resulta muy rentable para la elaboración de queso. Por ello, prácticamente la totalidad de la leche de oveja se destina a la producción de queso, correspondiendo un 13% a la producción artesanal y un 87% a la industrial. El destino industrial de la leche va en aumento debido a la citada problemática que presenta la elaboración de queso en la propia explotación.

La producción de leche de oveja en el mundo (Tabla 1) ha sido estimada por la FAO (1999) en 8 millones de Tm/año, lo cual representa aproximadamente el 2% del total mundial de leche producida. La UE-15 es uno de los mayores productores de leche de oveja del mundo (25%). Sus 5 países mediterráneos producen prácticamente la totalidad de la producción en la UE-15 2 millones de Tm/año. La producción de España en 1998 (Tabla 2) fue de 0.3 millones de Tm/año, situándose entre los principales productores europeos. La producción anual de

leche de oveja en España se mantiene constante desde hace 20 años, considerándose como una producción alternativa de gran interés y cuya demanda no está satisfecha, si no que por el contrario, va en aumento (MAPA, 1999) (Tabla 3).

**Tabla 1:** Producción de leche de vaca, oveja y cabra en 1998.

(x 10 <sup>6</sup> Litros de leche)	Vaca	Oveja	Cabra
<b>Mundial</b>	466347	8213	12211
<b>África</b>	17913	1565	2599
<b>N. y C. América</b>	91385	---	144
<b>EE.UU.</b>	71375	---	---
<b>S. América</b>	45325	35	184
<b>Oceanía</b>	21086	---	---
<b>Australia</b>	9731	---	---
<b>URSS</b>	---	---	---
<b>Asia</b>	82871	3831	7039
<b>Europa</b>	207768	2781	2245
<b>Europa-15</b>	120270	2069	1520
<b>Austria</b>	3090	---	16
<b>Bélgica-Lux.</b>	3700	---	---
<b>Dinamarca</b>	4668	---	---
<b>Finlandia</b>	2463	---	---
<b>Francia</b>	24500	243	480
<b>Alemania</b>	28500	---	22
<b>Grecia</b>	750	670	460
<b>Irlanda</b>	5581	---	---
<b>Holanda</b>	11100	---	---
<b>Portugal</b>	1750	97	42
<b>España</b>	6100	300	350
<b>Reino Unido</b>	13932	---	---
<b>Suecia</b>	3260	---	---
<b>Italia</b>	10876	759	150

Fuente: FAO (1999) y MAPA (1999).

**Tabla 2:** Evolución de la producción de leche de vaca, oveja y cabra en España.

(x 10 <sup>6</sup> Litros de leche)	1994	1995	1996	1997	1998
<b>Vaca</b>	5400	6016	6133	6108	6100
<b>Oveja</b>	300	226	320	284	300
<b>Cabra</b>	370	316	366	325	350

Fuente: MAPA (1999).

**Tabla 3:** Evolución de la producción de quesos con leche de vaca, oveja y cabra en España.

(x 10 <sup>6</sup> Kg de queso)	1992	1993	1994	1995	1996
<b>Queso de Vaca</b>	72	72	70	70	69
<b>Queso de Oveja</b>	12	14	15	16	17
<b>Queso de Cabra</b>	6	7	8	8	8
<b>Queso de mezcla</b>	132	134	139	132	136
<b>Queso fundido</b>	36	42	39	38	39
<b>TOTAL</b>	258	269	271	264	269

Fuente: Anuario Lácteo FENIL-ILE (1998).

### 1.2.1.- PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las principales propiedades se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 4:** Propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca y oveja.

	Leche de Vaca	Leche de Oveja
<b>Acidez titulable (°Dornic)</b>	15° – 18°	18° – 22°
<b>Conductividad (ohm<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)</b>	0.0040 – 0.0055	0.0038 – 0.0040
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>) a 15°C</b>	1.028 – 1.038	1.034 – 1.038
<b>pH</b>	6.5 – 6.7	6.4 – 6.7
<b>Punto crioscópico (°C)</b>	(-0.540) – (-0.550)	(-0.570) – (-0.575)
<b>Tensión superficial (Dinas/cm)</b>	42.3 – 52.1	44.9 – 48.7
<b>Viscosidad (mPa·s)</b>	1.95 – 2.55	2.86 – 3.93

Fuente: Anifantakis (1986), y Buxadé-Carbó (1997).

### 1.2.2.- COMPOSICIÓN

En la Tabla 5 se muestra la composición media de las leches de vaca y oveja.

- **Agua.** El porcentaje en agua oscila entre 80-85%, estas variaciones están principalmente afectadas por las fluctuaciones en el contenido graso que experimenta la leche de oveja a lo largo de su ciclo de lactación.
- **Lípidos.** En la leche de oveja, los triglicéridos representan el 98-99% del total de los lípidos, valor semejante al de la leche de vaca. Respecto a los ácidos grasos saturados, la leche de oveja se caracteriza por su elevado contenido en moléculas de 6 a 12 átomos de carbono. Los ácidos cáprico y caprílico representan del 6 al 10% de los ácidos grasos totales frente al 3-5% en la leche de vaca. En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, representan una tasa del 26% en la leche de oveja frente al 30% en la leche de vaca. Por lo que respecta a los ácidos grasos poliinsaturados, su contenido es del 5 y 4% en leche de oveja y vaca, respectivamente.

El olor y el gusto característico de la leche de oveja están en estrecha relación con el contenido de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono. El aroma particular de los quesos de leche de oveja es debido, a través de la lipólisis y los fenómenos asociados, a la composición de los lípidos de esta leche. En comparación con la leche de vaca, se observa que en la de oveja existe mayor número de triglicéridos en cuya composición intervienen ácidos grasos de cadena corta.

- **Proteínas.** La leche de oveja, al igual que la leche de vaca, posee un contenido en caseínas respecto a las proteínas totales que oscila entre el 78 y 80% (Tabla 6). Sin embargo, el mayor contenido proteico de la leche de oveja, ya que ésta presenta casi el doble de caseínas por litro de leche, constituye una característica de especial interés en la elaboración de quesos, dado su óptimo rendimiento y excelente aptitud frente a la coagulación.

Las proteínas séricas de la leche de oveja representan el 20-22% del total, porcentaje semejante al de la leche de vaca. Sin embargo, el contenido de éstas por litro de leche de oveja, al igual que ocurre con las caseínas, es casi el doble que en la leche de vaca, por lo que en las regiones donde se utiliza la leche de oveja en la industria quesera, el lactosuero que se obtiene, se aprovecha para la elaboración de quesos del tipo *Requesón* o *Ricotta*.

La leche de oveja contiene poco nitrógeno no proteico, entorno al 5%, siendo en este aspecto semejante a la leche de vaca. La relación entre nitrógeno proteico y nitrógeno total no es constante a lo largo del período de lactación, disminuyendo a medida que avanza este

período, aspecto que resulta interesante al evaluar el rendimiento quesero de la leche por lo que respecta al contenido en proteínas.

**Tabla 5:** Composición media de la leche de vaca y oveja

(%)	Leche de Vaca	Leche de Oveja
<b>Extracto seco</b>	12.5 – 13	15 – 20
<b>Materia grasa</b>	3 – 4	6 – 10
<b>Proteína total</b>	3 – 3.6	5 – 6.5
<b>Lactosa</b>	4.5 – 5	4 – 5
<b>Cenizas</b>	0.7 – 0.9	0.9 – 1.1

*Fuente:* Alichanidis y Polychroniadou (1996), Anifantakis (1986), y Muñoz y Yoldi (2000).

**Tabla 6:** Proporción de las diferentes proteínas en la leche de vaca y oveja

(% del Total Proteínas)	Leche de Vaca	Leche de Oveja
<b>Caseínas (Cn)</b>	<b>78 - 80</b>	<b>78 - 80</b>
<b>a<sub>S1</sub>+a<sub>S2</sub>-Cn</b>	28.4 – 30.8	37.3 – 44.6
<b>b-Cn</b>	26.9 – 28.4	22.2 – 28.4
<b>k-Cn</b>	10 – 10.3	8.4 – 9.6
<b>Proteínas Séricas</b>	<b>20 - 22</b>	<b>20 - 22</b>
<b>a-lactalbúmina</b>	4.2 – 4.6	1.9 – 2.3
<b>b-lactoglobulina</b>	10.5 – 12	14.1 – 15.3
<b>Seroalbúmina</b>	1.1 – 1.5	1.9 – 2.1
<b>Immunoglobulinas</b>	2.5 – 3.3	3.6 – 4.2

*Fuente:* Anifantakis (1986).

- **Glúcidos.** En la leche de oveja, la tasa media se sitúa entre 40 y 50 g/l. La lactosa tiene un valor alimentario y tecnológico. En la práctica quesera, el contenido de lactosa disponible en la leche de oveja es más que suficiente para asegurar las fermentaciones lácticas.
- **Sales minerales.** En la Tabla 7 se muestra la composición en sales minerales de la leche de oveja, que dependiendo del tipo de sal que se trate, su contenido medio difiere en mayor o menor grado respecto a la de leche de vaca.

- **Vitaminas.** La composición en vitaminas de la leche de oveja ha sido poco estudiada. Al igual que le ocurre con la composición de sales minerales, es muy variable en función de cada una de ellas. Quizás cabe destacar el contenido de vitamina C y B<sub>3</sub> en leche de oveja respecto al de vaca (Tabla 8).

**Tabla 7:** Proporción de las diferentes sales minerales en la leche de vaca y oveja

(mg / 100g leche)	Leche de Vaca	Leche de Oveja
<b>(Na) Sodio</b>	49	44
<b>(K) Potasio</b>	152	136
<b>(Ca) Calcio</b>	119	193
<b>(P) Fósforo</b>	93	158
<b>(Mg) Magnesio</b>	13	18
<b>(Zn) Zinc</b>	0.42	0.2
<b>(Cu) Cobre</b>	0.02	0.11
<b>(Fe) Hierro</b>	0.05	0.1
<b>(Mn) Manganesio</b>	0.01	0.02

Fuente: Anifantakis (1986), y Haenlein (1996).

**Tabla 8:** Proporción de las diferentes vitaminas en la leche de vaca y oveja

(mg / 100g leche)	Leche de Vaca	Leche de Oveja
<b>Retinol (A)</b>	52	83
<b>Tiamina (B<sub>1</sub>)</b>	40	80
<b>Rivoflavina (B<sub>2</sub>)</b>	170	320
<b>Niacina (B<sub>3</sub>)</b>	80	410
<b>Piridoxal (B<sub>6</sub>)</b>	60	80
<b>Cianocobalamina (B<sub>12</sub>)</b>	0.4	0.6
<b>Ác. Ascórbico (C)</b>	1000	5000
<b>Calciferol (D)</b>	0.03	0.18
<b>Tocoferol (E)</b>	90	110
<b>Biotina (H)</b>	1.9	2.5
<b>Ác. Fólico</b>	6	5
<b>Ác. Pantoténico</b>	350	450

Fuente: Alichanidis y Polychroniadou (1996).

### **1.2.3.- APTITUD QUESERA**

Tal y como se ha indicado anteriormente, la leche de oveja posee una composición cuantitativa que la hace idónea para la elaboración de queso, especialmente por su elevado contenido en proteínas y grasa. La práctica cotidiana de la quesería demuestra que con un determinado volumen, se preparan por término medio, dos veces más queso con la leche de oveja que con la leche de vaca. Diferentes estudios (IDF, 1994) aportan información precisa respecto al contenido de proteínas coagulables y las tasas de recuperación de la materia grasa y de los compuestos nitrogenados totales.

### **1.2.4.- ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**

En la leche de oveja, las contaminaciones de origen mamario son poco importantes y, en los rebaños sanos, insignificantes. Como en otros tipos de leche, las contaminaciones microbianas habituales son de origen externo, debidas al medioambiente y a las condiciones de recogida. La contaminación medioambiental primaria puede ser más importante que en el rebaño bovino, ya que, para obtener la misma cantidad de leche, es preciso ordeñar a un gran número de animales.

Conviene mencionar, que en las primeras horas después del ordeño, la leche de oveja presenta una resistencia considerable a las implantaciones bacterianas, debido en gran parte a la propia actividad inmunológica de la leche y a su alto contenido mineral (Assenat, 1991; Cottier, 1991).

Dependiendo de la calidad inicial de la leche, ésta se puede mantener con una calidad adecuada durante 2-5 días a 5 °C o durante 4-13 días a 0 °C. Se recomienda que la leche de oveja con recuentos iniciales superiores a  $10^5$  ufc/ml no se conserve más de 3 días a 2-4 °C o 2 días si la temperatura está comprendida entre 6 y 8 °C (Banks y col., 1988; Griffiths y col., 1987).

### **1.2.5.- CONTROL DE CALIDAD Y SISTEMA DE PAGO**

Para obtener la misma cantidad de leche con ovejas que con vacas es necesario ordeñar de 10 a 15 veces más animales. Esto hace que el riesgo de contaminación a través de los pezones se vea sensiblemente incrementado. Por otra parte, algunas prácticas aplicables para el ordeño de vacas, como el lavado previo de la mama, son difíciles de realizar con las

ovejas. Por esta razón, es más difícil obtener mejor calidad bacteriológica en la leche de oveja que en la de vaca.

La calidad de la leche también puede verse afectada por la ingestión de medicamentos por los animales. Dada la imposibilidad de proceder al análisis sistemático de todas las sustancias activas que pueden ser utilizadas por los laboratorios que comercializan las medicinas veterinarias, se prohíbe la administración de todo tipo de medicamentos en período de ordeño. Por otro lado, el grupo de los antibióticos, que pasan a la leche después de un tratamiento efectuado generalmente por inyección, tecnológicamente tienen un efecto que podría inhibir la fermentación láctica, lo que puede favorecer un eventual desarrollo de los coliformes y otros microorganismos oportunistas. En este sentido, la reglamentación es muy estricta, ya que prevé que la leche que provenga de una oveja tratada con antibióticos no debe ser comercializada hasta los 6 ordeños posteriores al fin del tratamiento. Estos controles se efectúan sistemáticamente en las leches de mezcla por las cadenas de recogida.

Si la calidad bacteriológica de la leche ha sido considerada durante mucho tiempo como prioritaria frente a la composición química, no es menos cierto que este último aspecto preocupa también a los ganaderos y a los industriales. A los primeros, porque la leche de oveja se paga teniendo en cuenta sus rendimientos queseros, y a los segundos porque, los quesos destinados a la exportación, deben garantizar un porcentaje mínimo de materia grasa por materia seca, en función del tipo de queso.

### **1.3.- MODIFICACIONES EN LECHE POST-RECOGIDA (REFRIGERACIÓN)**

El hecho de enfriar la leche y conservarla a bajas temperaturas puede tener consecuencias importantes en la calidad de ésta como materia prima. En este apartado, consideraremos las modificaciones fisicoquímicas, bioquímicas y microbiológicas de la leche a causa de la refrigeración, y las consecuencias de estas modificaciones sobre los procesos de fabricación.

#### **1.3.1.- MODIFICACIONES FISICOQUÍMICAS**

Los cambios más acusados debidos a la refrigeración de la leche se producen en las caseínas y en la distribución de las sales entre la fase soluble y coloidal (Puhan, 1989). Existe una relación directamente proporcional entre el contenido mineral y el tamaño de la micela, siendo importante desde el punto de vista de la estabilidad, el mantenimiento de un cierto

equilibrio salino entre la fase coloidal y la fase soluble. Cuanto mayor sea la mineralización de las micelas, mayor es la posibilidad de un incremento de tamaño de las mismas. Sin embargo, las bajas temperaturas provocan una disgregación de la estructura micelar en unidades más pequeñas, debido a la desmineralización causada por la mayor solubilidad que presenta el fosfato cálcico a bajas temperaturas, por lo que la refrigeración puede modificar la estabilidad del sistema, especialmente durante la coagulación.

Por otra parte, a medida que desciende la temperatura y transcurre el tiempo de almacenaje en refrigeración, la cristalización de los triglicéridos al igual que la de los fosfolípidos de la membrana aumenta progresivamente. Si el enfriamiento es rápido, se produce la formación de pequeños cristales que no alteran demasiado la estructura de éstos, pero si es lento, se forman cristales gruesos que pueden provocar daños en la membrana o la aparición de fisuras. En este caso, los triglicéridos pueden salir del glóbulo graso y esparcirse por la superficie. La capacidad hidrófila desaparece en parte, aumentando la tendencia de los glóbulos grasos a formar agregados, incrementándose el cremado.

### **1.3.2.- MODIFICACIONES BIOQUÍMICAS**

La plasmina, enzima proteolítico natural de la leche, presenta una gran actividad durante el almacenamiento de la leche en refrigeración. Sin embargo, la acción de las proteasas de las bacterias psicrótrofas, incluso con niveles de población relativamente moderados, son las que muestran las peores consecuencias tecnológicas. Entre los problemas más frecuentes pueden citarse: la disminución de la estabilidad térmica de la leche, la cual puede provocar su coagulación a lo largo del tratamiento térmico y la degradación de las caseínas con pérdidas del rendimiento en la fabricación de quesos, así como, la producción de sabores amargos.

La actividad de las lipasas no se ve estimulada por las temperaturas de refrigeración. Sin embargo, es frecuente detectar una considerable lipólisis en leches refrigeradas, las cuales presentan sabores y olores extraños. Esto se puede explicar por la presencia de lipasas procedentes de microorganismos psicrótrofos, las cuales son muy resistentes a las temperaturas de los tratamientos térmicos aplicados en la leche (Driessen, 1993). Además, las lipasas poseen mayor accesibilidad a la grasa, debido al daño sufrido en la membrana del glóbulo por las bajas temperaturas.

### 1.3.3.- MODIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS

La refrigeración en tanques, como se realiza en las granjas, influye considerablemente en la naturaleza de la microbiota de la leche cruda. Antes de refrigerar la leche, la microbiota dominante son bacterias lácticas, mientras que, la conservación de la leche a bajas temperaturas provoca una selección de los microorganismos psicrótrofos, y en particular algunos de ellos.

Los microorganismos psicrótrofos son capaces de multiplicarse a temperaturas iguales o inferiores a 7 °C, cualquiera que sea su temperatura óptima de crecimiento (Cousin, 1982). *Pseudomonas fluorescens* se desarrolla rápidamente, aunque es normal observar una prolongación del tiempo de generación a temperaturas inferiores a 5 °C. Los riesgos de alteración son elevados cuando la leche cruda contiene más de  $1 \times 10^6$  ufc/ml de bacterias psicrótrofas. En una leche de mediana calidad bacteriológica, conservada a 4 °C, este número se alcanza generalmente a los 3 días del ordeño.

Además, otro riesgo muy importante radica en que la mayoría de microorganismos psicrótrofos producen lipasas y proteasas termoresistentes muy activas que pueden alterar la leche y los productos lácteos (Guamis y col., 1987a, 1987b), tal y como se ha comentado anteriormente.

### 1.4.- LA GRASA LÁCTEA Y EL GLÓBULO GRASO

La estabilidad de la grasa dispersa en la fase acuosa de la leche se debe a la existencia de una membrana de naturaleza lipoproteica, cargada negativamente, que impide la salida de la grasa y asegura la repulsión electrostática entre los glóbulos, cuyo diámetro varía de 0.1 a 20  $\mu\text{m}$ .

La grasa del interior del glóbulo está compuesta por lípidos de bajo punto de fusión, líquidos a temperatura ambiente, y rodeados por glicéridos neutros, fosfolípidos y proteínas. El ordenamiento de los constituyentes individuales no es sencillo de definir, sin embargo, es fácil imaginar que los fosfolípidos sirven como nexo de unión entre los lípidos y la película proteica gracias a su naturaleza anfifílica.

Las proteínas de la membrana, son glicoproteínas que contienen hexosas, hexosaminas, ácido siálico, y proteínas rojas (pseudo-queratina); las proporciones respectivas varían según el origen de las leches (refrigeradas, mamáticas). Por otra parte, la composición

en aminoácidos revela valores elevados de ácido glutámico y aspártico, que junto con el ácido siálico, son los que aportan la carga negativa a la membrana (Luquet, 1991).

La fracción lipídica de la membrana está constituida mayoritariamente por fosfolípidos, y también, pero en menor grado, por glicéridos (mayoritariamente triglicéridos). También se encuentran otros compuestos liposolubles como colesterol, ácidos grasos libres, glicerol e hidrocarburos.

La cantidad de enzimas presentes en la membrana varía en función de factores zootécnicos y tecnológicos, y todavía no está aclarada la presencia o no de lipasa (Luquet, 1991).

Los glóbulos de grasa no solamente son las partículas más grandes de la leche sino que también son las partículas más ligeras (con una densidad de  $0.93 \text{ g/cm}^3$  a  $15.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), por lo que tienden a migrar hacia la superficie cuando la leche se deja en reposo.

La velocidad de ascenso de los glóbulos grasos se rige por la ley de Stokes, por lo que cuanto menor es el tamaño de los glóbulos de grasa, más lento es el proceso de cremado. Por otra parte, cuando tiene lugar la agregación de los glóbulos bajo la influencia de la aglutinina, la migración de la grasa a la superficie se produce muy rápidamente, sin embargo, la aglutinina presenta una gran termolabilidad, por lo que tratamientos tales como  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 min o  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 min. son suficientes para desnaturalizarla y producir la disgregación de los glóbulos de grasa.

Si la integridad del glóbulo graso se ve alterada por fenómenos físicos o microbianos, se produce de forma irreversible la salida de la grasa del glóbulo al exterior, que al no estar protegida por la membrana, será particularmente sensible a las alteraciones lipolíticas.

La estabilidad física de la leche se consigue mediante homogenización. Por lo que al disminuir el diámetro de los glóbulos grasos a menos de  $1 \text{ }\mu\text{m}$  se evita el cremado espontáneo de las leches, sin embargo, puede verse incrementada la lipólisis, si previa o inmediatamente después de la homogenización no se inactiva la lipasa.

#### **1.4.1.- LIPOLISIS ESPONTÁNEA**

La lipólisis espontánea se define como el incremento en ácidos grasos libres que desarrolla, aparentemente sin agitación mecánica, una leche cruda. Este es el aspecto menos comprendido de la lipólisis, ya que incluso animales mantenidos en condiciones idénticas muestran variaciones marcadas en este aspecto.

En el desarrollo de la lipólisis espontánea de las leches individuales intervienen diferentes factores independientes del animal, tales como:

- Constituyentes procedentes de la sangre: probablemente sea la causa más importante.
- El período de lactación: particularmente sensible a la lipólisis es el final de éste.
- La alimentación: la calidad y cantidad de alimentos, ya que la leche que proviene de animales bien alimentados es mucho menos susceptible a la lipólisis.
- Las mamitis y el contenido de células somáticas: las leches mamíticas presentan mayor susceptibilidad a la lipólisis espontánea, debido a que presentan mayor contenido de enzimas procedentes de las células somáticas y a que, los glóbulos grasos contienen menos material de membrana, probablemente por la proteólisis de ésta (Murphy y col., 1989).

#### **1.4.2.- LIPOLISIS INDUCIDA**

La lipólisis inducida se define como la lipólisis desencadenada en la leche cruda por la intervención de factores que alteran la integridad del glóbulo graso.

Existen multitud de factores que podrían modificar la integridad de la membrana del glóbulo graso y favorecer así la lipólisis (Jandal, 1996). Entre los más importantes, encontramos algunos tratamientos como son la agitación mecánica, adición de compuestos químicos (sulfatos de cobre, cloruro de sodio, nitratos, etc.) y alcalinización de la leche.

Una vez inducida la lipólisis, ésta se desarrolla rápidamente, con una estabilización posterior, ya que no se observa una mayor acumulación de ácidos grasos libres a pesar de la presencia de un exceso de sustrato. Esta limitación de la lipólisis se atribuye a la acumulación de ácidos grasos libres (inhibidores de la reacción) en la interfase materia grasa-agua. Sin embargo, cuando se continúa con la homogenización o agitación, la interfase se ve liberada de los ácidos grasos libres acumulados, facilitándose de nuevo la unión enzima-sustrato que conduce a una reanudación temporal de la lipólisis.

#### **1.4.3.- LIPOLISIS MICROBIANA**

Además de la lipasa endógena, durante el almacenamiento en refrigeración, se desarrolla una microbiota psicrófila, que secreta lipasas con una mayor actividad que las lipasas endocelulares. La producción de lipasas exocelulares es óptima entre 20 y 21 °C. La temperatura óptima para su actividad enzimática es de 35 °C, aunque en la práctica estas

lipasas permanecen activas a temperaturas muy bajas, conservando aún algunos de estos enzimas el 50% de su actividad a 0 °C.

Las lipasas microbianas tienen una acción específica sobre los triglicéridos de la leche y no conducen necesariamente a la liberación de los mismos ácidos grasos que la lipasa endógena. Así por ejemplo, la lipasa de *Pseudomonas fragi* tiene preferencia en la hidrólisis del ácido caprílico y la de *Geotrichum candidum* hidroliza preferentemente el ácido oleico, cualquiera que sea su posición en el triglicérido.

## **1.5.- MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA LECHE**

La leche segregada por la mama, en condiciones normales, es estéril. Pero antes de abandonar la ubre es infectada por bacterias que entran a través del canal del pezón, siendo éstas normalmente inofensivas y reducidas en número.

La leche, además de ser un medio nutritivo, es también un medio favorable para la multiplicación de microorganismos desde el punto de vista físico. Además, al ser un producto de origen animal, sujeto a una gran diversidad de métodos de producción, se puede contaminar con un amplio espectro de microorganismos.

Cuando la leche se enfría y se mantiene a temperaturas inferiores a 4 °C se previene normalmente la multiplicación de las bacterias, al menos en las primeras 24 horas, y la microbiota es, por tanto, similar a la presente originalmente, tras el ordeño.

Inicialmente, la microbiota predominante consta de bacterias aerobias mesófilas y es difícil detectar más de un 10-20% de bacterias psicrótrofas. Sin embargo, con el transcurso del tiempo en refrigeración se produce una proliferación de las mismas (Walker, 1988). Inicialmente, la leche presenta una microbiota en bacterias psicrótrofas muy variada, pero a medida que se prolonga la refrigeración se produce un predominio del género *Pseudomonas* que representa un 90%, y en especial *P. fluorescens* (Nuñez y col., 1984; Shelly y col., 1987). También se encuentran bacterias Gram (+), en especial cocos, siendo los géneros más representativos *Micrococcus* y *Streptococcus*, los cuales pueden llegar a ser más del 10% de toda la microbiota presente a 6 °C. El género *Bacillus* no es muy habitual por debajo de 5 °C, aumentando sus aislamientos a más del 5% a partir de los 10 °C, si bien diversas cepas pueden crecer a 2 °C (Griffiths y Phillips, 1990).

Muchas bacterias pueden encontrarse de forma casual en la leche. Pueden vivir e incluso reproducirse en ella, pero la leche es frecuentemente un medio de crecimiento

inadecuado para ellas. Algunas de estas bacterias mueren cuando compiten con especies que encuentran este medio de cultivo más favorable.

Los grupos de bacterias presentes en la leche pueden dividirse en:

- **Bacterias acidolácticas.** Pueden encontrarse en plantas, en los intestinos de los animales y también en la leche. Son anaerobias facultativas. La mayor parte de ellas mueren por calentamiento a 70 °C, aunque la temperatura letal para algunas es de 80 °C. Prefieren la lactosa como fuente de carbono, fermentándola a ácido láctico. La capacidad fermentativa varía de acuerdo con las especies.
- **Bacterias coliformes.** Son anaerobias facultativas con una temperatura óptima de crecimiento de 30-37 °C. Se encuentran en los intestinos, estiércol, suelo, aguas contaminadas y plantas. Fermentan la lactosa produciendo ácido láctico y otros ácidos orgánicos, anhídrido carbónico e hidrógeno y descomponen las proteínas de la leche, dando lugar a un olor y un sabor desagradables. Algunas bacterias coliformes también causan mastitis, pudiendo causar serios problemas durante la fabricación del queso, además de provocar malos sabores y formación de gas pueden causar el hinchamiento de los mismos. El metabolismo de las bacterias coliformes cesa a pH justo por debajo de 6. Esto explica su actividad en las primeras fases de la elaboración del queso, antes de la fermentación de la lactosa. Las bacterias coliformes son destruidas por la pasteurización HTST. Su determinación es útil en los controles rutinarios de la calidad microbiológica en las industrias lácteas.
- **Bacterias formadoras de ácido butírico.** Comunes en la naturaleza, se las encuentra en suelos, plantas, estiércol, etc., y llegan muy fácilmente a la leche. Los piensos y ensilados almacenados en condiciones defectuosas, pueden tener unos recuentos muy altos de esporas de bacterias ácido-butíricas. En consecuencia, la leche puede ser infectada de forma importante por microorganismos y esporas de este tipo. Las bacterias ácido-butíricas son del tipo anaerobio, forman esporas y tienen una temperatura óptima de crecimiento a 37 °C. No se desarrollan bien en leche que contenga oxígeno, pero sí lo hacen en los quesos donde las condiciones anaerobias prevalecen sobre las demás. Estos procesos fermentativos dan lugar a grandes cantidades de anhídrido carbónico, hidrógeno y ácido butírico. El queso presenta defectos de hinchamiento, con una textura irregular y sabores extraños.

- **Bacterias formadoras de ácido propiónico.** Esta categoría de bacterias comprende un número variado de especies. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, y varias especies sobreviven a la pasteurización HTST. Los cultivos puros de estas bacterias se utilizan junto con ciertos lactobacilos y lactococos en la fabricación de los quesos *Emmental*, *Gruyère*, *Jarslberg*, *Grevé* y *Maasdam*, en los que son responsables de la formación de ojos y contribuyen a su característico sabor.
- **Bacterias de la putrefacción.** Son aquellas que producen enzimas proteolíticos. Los productos de la proteólisis pueden llegar a aportar un aroma desagradable al degradarse hasta amoníaco, que es muy volátil. Algunas de estas bacterias son psicrótrofas. Algunas son utilizadas en procesos de elaboración de productos lácteos, pero en general son bacterias que pueden originar problemas. La categoría de las bacterias de la putrefacción comprende un gran número de especies, tanto cocos como bacilos, que crecen tanto en medio aerobio como anaerobio. Contaminan la leche, procedentes del estiércol, piensos y agua. Muchas de ellas, como es *Pseudomonas fluorescens*, se encuentran normalmente en suelos y aguas contaminadas, ésta, produce lipasas y proteasas muy resistentes al calor. Además de la lipasa, algunas bacterias de la putrefacción no deseadas producen un tipo de enzima similar a la renina, que puede coagular la leche sin acidificarla (coagulación dulce). Un típico productor de gas es el *Clostridium sporogenes*, que puede producir, bajo condiciones anaerobias y en quesos particularmente procesados, poderosas fermentaciones con malos olores.

## **1.6.- TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN DE LA LECHE**

### **1.6.1.- TRATAMIENTOS TÉRMICOS**

El tratamiento térmico es el proceso tecnológico más frecuentemente aplicado para la conservación de la leche (Tabla 9).

Muchas centrales lecheras de gran tamaño, y también pequeños granjeros, no pueden pasteurizar toda la leche inmediatamente por lo que aplican un tratamiento térmico suave de 63-65 °C durante 15-30 seg., llamado termización, para reducir momentáneamente la carga microbiana hasta que se efectúe el tratamiento térmico definitivo.

Por otro lado, la termización provoca la germinación de las esporas, lo que facilita la destrucción de esos microorganismos en el tratamiento de pasteurización. Un inconveniente

de la termización es el posible crecimiento de microorganismos como *Listeria monocytogenes* que se desarrollan al resistir las temperaturas aplicadas y luego no encontrar competencia microbiana.

**Tabla 9:** Tratamientos térmicos más utilizados en las industrias lácteas

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Termización</b>	63 – 65	15 – 30 seg
<b>Pasteurización</b>		
<sup>a</sup> <b>HTST</b>	72 – 75	15 – 20 seg
<sup>b</sup> <b>LTLT</b>	63 – 65	30 min
<b>Ultra Pasteurización</b>	125 – 138	2 – 4 seg
<b>Esterilización</b>		
<b>en envase</b>	115 – 120	20 – 30 min
<sup>c</sup> <b>UHT</b>	135 – 140	2 – 4 seg

<sup>a</sup> High Temperature Sort Time.

<sup>b</sup> Low Temperatura Long Time

<sup>c</sup> Ultra High Temperature (directo o indirecto).

La pasteurización consiste en cualquier tratamiento térmico que asegure la destrucción de *Mycobacterium tuberculosis*, sin afectar de manera importante a las propiedades físicas y químicas de la leche. Tras el tratamiento de pasteurización se necesita un envasado higiénico, para evitar recontaminaciones. Actualmente podemos encontrar dos grandes grupos de tratamientos de pasteurización: alta y baja. La pasteurización baja se caracteriza por aplicar combinaciones de temperatura y tiempo que inactivan el enzima fosfatasa alcalina, mientras que las altas, además de éste, inactivan la peroxidasa, que es más termoresistente (R.D. 1679/1994). En la actualidad se aplican diferentes tipos de pasteurización:

- **Pasteurización LTLT** (Low Temperature Long Time), tratamientos de larga duración (30 min.) a temperaturas suaves (63 °C). Pasteurización baja.
- **Pasteurización HTST** (High Temperature Short Time), combinaciones de altas temperaturas (72-75 °C) durante tiempos cortos (15-20 seg.), estas combinaciones variarán según la carga microbiana inicial de la leche. Pasteurización baja.
- **Ultra Pasteurización**, suele aplicarse cuando, por algún motivo, se necesita prolongar la vida útil del producto. Consiste en combinaciones de 125-138 °C durante 2-4 seg. También se aplica como tratamiento de preesterilización antes del envasado para posterior esterilización en autoclave o torre. Pasteurización alta.

Otro tratamiento térmico habitual aplicado a la leche son los tratamientos de esterilización:

- **Tratamientos UHT** (Ultra High Temperature), proceso que consiste en combinaciones de temperatura entre 135-140 °C durante periodos muy cortos 2-4 seg. Esta técnica requiere de un posterior envasado aséptico. Este proceso se puede aplicar a la leche de forma directa o indirecta. El tratamiento de UHT directo, consiste en la inyección de vapor directamente en la leche, seguido de una parcial evaporación y enfriamiento por expansión bajo vacío, mientras que en el tratamiento de UHT indirecto, el intercambio térmico se realiza mediante intercambiadores de placas o tubulares.
- **Esterilización en el envase**, tras un precalentamiento de la leche a unos 80 °C, ésta se envasa (normalmente en botellas de vidrio o plástico) y aún caliente se lleva a autoclaves discontinuos o a una torre de presión hidrostática en continuo, donde alcanzan temperaturas de 115-120 °C durante 20-30 min.

### **1.6.2.- NUEVAS TECNOLOGÍAS**

En las últimas décadas se ha producido un incremento en el desarrollo de nuevas tecnologías para la conservación y obtención de alimentos, como consecuencia del creciente interés de las industrias alimentarias en la innovación tecnológica. Por otra parte, el aumento en la demanda, por parte de los consumidores, de productos de alta calidad, con características organolépticas y nutritivas similares a los productos frescos o naturales, con el mínimo riesgo sanitario, ha contribuido en gran medida al estudio y desarrollo de estas nuevas tecnologías.

#### **1.6.2.1.- Tratamientos con efecto térmico**

- **Infusión altamente calorífica.** Consiste en combinar tratamientos térmicos directos (infusión de vapor) e indirectos (intercambiadores), consiguiendo leches de mejor calidad con bajos niveles de lactulosa, mejor estabilidad proteica, mayor destrucción microbiana (en especial de esporulados) y cierto ahorro energético (De Jong y col., 1994; Jensen, 1996).
- **Ohmnización.** Esta tecnología se basa en el paso de corriente eléctrica a través de los alimentos, los cuales ofrecen una resistencia a su paso, produciendo un incremento de temperatura. Así, los alimentos se calientan hasta conseguir el efecto térmico esperado.

Es un proceso muy útil para el tratamiento de líquidos muy viscosos o con partículas sólidas en suspensión (Fryer, 1995; Larkin y Spinak, 1996).

- **Mano-termo-sonicación.** En realidad, este proceso consiste en la combinación de tres tratamientos físicos; la utilización de presión (hasta 1 MPa), alta temperatura (hasta 140 °C) y ultrasonidos (hasta 340 W, 145  $\mu\text{m}$ ) (Sala y col., 1995). Estos últimos provocan ciclos de expansión y compresión en el líquido tratado, dando lugar a cavitaciones, que es la principal causa que se atribuye a la destrucción microbiana por rotura mecánica de la membrana bacteriana (Earnshaw y col., 1995; Sala y col., 1995).
- **Microondas.** Las microondas entre 300 MHz y 300 GHz, provocan fricción molecular por los cambios alternos en la orientación de las mismas, lo que conduce a un incremento de la temperatura del alimento. La destrucción microbiana y otras consecuencias de las microondas son debidas al efecto térmico (Villamiel y col., 1997)

#### 1.6.2.2.- Tratamientos sin efecto térmico

La búsqueda de alternativas a los tratamientos térmicos, ha sido motivada por el conocimiento de las pérdidas de valor nutritivo y cambios en las características organolépticas que sufren los alimentos cuando se someten a este tipo de tratamientos. Esto ha forzado el estudio y desarrollo de nuevas tecnologías con el objetivo de asegurar la calidad microbiológica, así como, también el valor nutritivo y las características organolépticas de los alimentos.

- **Alta presión hidrostática.** Objeto de este trabajo, será tratada en el apartado 1.7.
- **Irradiación.** Proceso que consiste en aplicar radiación ionizante a los alimentos de una forma controlada, ya que legalmente el límite máximo de radiación a que puede ser expuesto un alimento es de 10 KGy (muy inferior al nivel necesario para producir problemas de salud o nutricionales). Actualmente, aunque parece seguro, carece de la aceptación de los consumidores, al verse asociado a todo lo que conlleva la palabra nuclear (Olson, 1998; Sendra y col., 1996).
- **Microfiltración.** Los alimentos líquidos son forzados a pasar a través de unas membranas con poros que oscilan entre 0.1 y 10  $\mu\text{m}$  en función del objetivo perseguido: retener partículas o microorganismos. Un problema para tratar la leche por microfiltración es la

presencia de glóbulos grasos, que deben ser separados con anterioridad para no provocar la colmatación de las membranas. Además, según Glaeser (1996), éste tratamiento no es totalmente eficaz y no puede considerarse microbiológicamente seguro.

- **Pulsos eléctricos de alto voltaje.** Consiste en la aplicación de un campo eléctrico de alto voltaje (5-70 KV/cm) durante tiempos muy cortos ( $\mu$ s-ms) sobre un alimento líquido. Causa un pequeño incremento de la temperatura, dando lugar a la formación de radicales libres y aumento de la permeabilidad en las membranas, siendo ésta, la principal causa de la destrucción microbiana (Barsotti y Cheftel, 1999; Sitzmann, 1995).
- **Pulsos luminosos de alta intensidad.** Se trata de una tecnología que consiste en aplicar pulsos luminosos (25% ultravioleta, 45% visible y 30% infrarrojo) de intensidades muy altas y longitudes de onda entre 200 y 1100 nm en la superficie de los alimentos. Producen una reducción bacteriana considerable, prolongando la vida comercial del producto, sin apenas alterar las características organolépticas y nutritivas de éstos (Dunn, 1996; Dunn y col., 1995).

## 1.7.- LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Los fenómenos de presurización vienen regidos por dos principios fundamentales. El primero, el principio de la isostática, establece que los cambios de presión son prácticamente instantáneos y uniformes, independientemente del volumen y geometría de la muestra. El segundo, el principio de Le Chatelier, el cual postula que todo fenómeno que va acompañado de una disminución de volumen se ve favorecido por la presión y viceversa (Mozhaev y col., 1994).

Los cambios de volumen que pueden tener lugar en un proceso químico, pueden calcularse a partir de la constante de equilibrio, según la ecuación siguiente:

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

donde  $\Delta V$  es el cambio de volumen (ml,  $\text{mol}^{-1}$ ), K es la constante de equilibrio, P es la presión ( $0.1 \text{ MPa} \cong 1 \text{ atm}$ ), T es la temperatura ( $^{\circ}$  kelvin) y R es la constante de los gases ( $82 \text{ ml, atm, mol}^{-1}, ^{\circ} \text{ kelvin}^{-1}$ ).

Lo expuesto anteriormente puede conducir a modificaciones en las moléculas de los sistemas bioquímicos cuando sobre ellas actúan las altas presiones. Así los **enlaces covalentes**, debido a su baja comprensibilidad, no se ven alterados a presiones inferiores de

1000 MPa, por lo que la estructura primaria de las proteínas no se modifica (Mozhaev y col., 1994; Gross y Jaenicke, 1994). La alteración de las **interacciones electrostáticas** dependerá de la disposición de las cargas iónicas, así como de su signo. En general, las altas presiones favorecen este tipo de interacción si los grupos ionizados de signos opuestos se encuentran solvatados, mientras que una deshidratación de los grupos ionizados, las dificultará (Mozhaev y col., 1994). En general, las **interacciones hidrofóbicas** se ven desfavorecidas por el incremento de presión, ya que requieren un aumento de volumen (Mozhaev y col., 1994), aunque algunos autores han observado un incremento de éstas a determinadas presiones (Ohmiya y col., 1989). Por otra parte, el establecimiento de interacciones **puentes de hidrógeno** parece que varían notablemente en función de la presión que se instaura. Según estudios de Gross y Jaenicke (1994) y Mozhaev y col. (1994), los puentes de hidrógeno apenas se ven afectados por las altas presiones. Sin embargo, otros estudios realizados por Smeller y col. (1995) y Tauscher (1995), concluyen que el incremento de la presión favorece y afianza este tipo de interacciones, ya que las estructuras químicas afectadas se encuentran más próximas para interactuar.

### 1.7.1.- EFECTO SOBRE LOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS

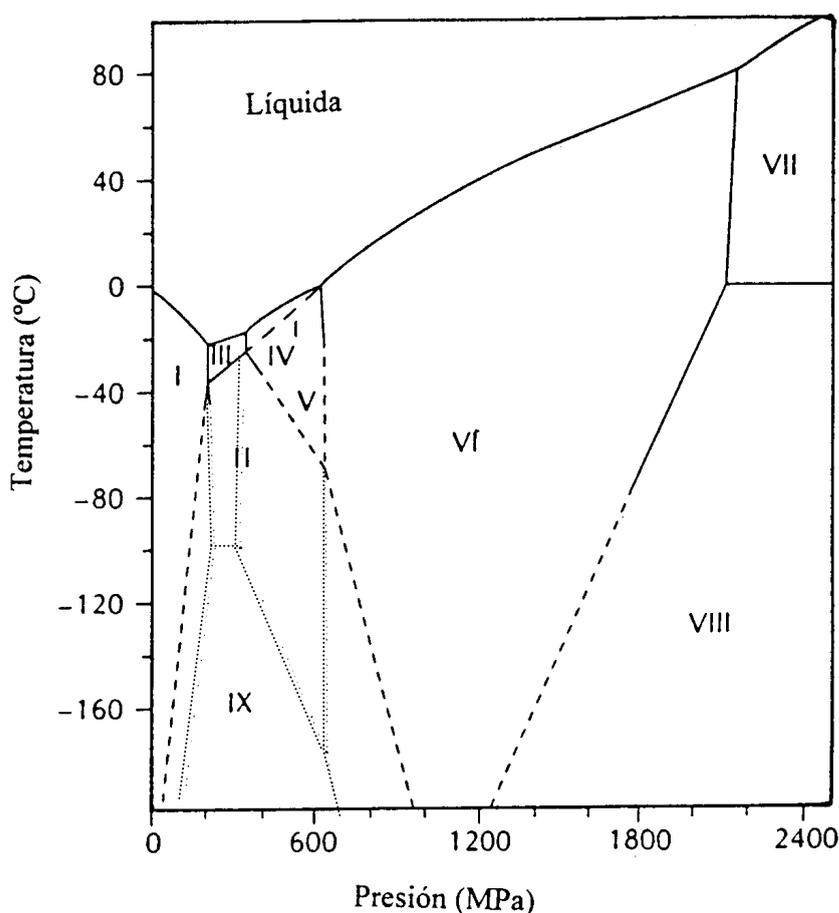
- **Agua**

Las propiedades fisicoquímicas del agua se ven modificadas bajo los efectos de la presión. Gran parte de los alimentos que consumimos están compuestos en su mayoría por agua, por lo que los cambios que tienen lugar en el agua bajo las altas presiones serán extrapolables a los alimentos ricos en ésta.

Al contrario que los gases, los líquidos como el agua y los aceites son poco compresibles. A modo de ejemplo, según Tsiklis (1968), el agua experimenta reducciones de 3.7, 6.7, y 11.1% de su volumen a las presiones de 100, 200, y 400 MPa, respectivamente, a 50 °C (Tabla 10).

La disociación del agua y de los ácidos y bases débiles se ve favorecida por la presión, así pues, pueden producirse cambios en el pH (a 100 MPa y 25 °C el  $\Delta\text{pH} = -0.73$ ) (Cheftel, 1995). Aunque el fenómeno es reversible cuando se restablece la presión atmosférica, estos cambios de pH podrían ser suficientes para provocar modificaciones que condujeran a cambios importantes como desnaturalización proteica, inactivación microbiana, etc. La compresión adiabática del agua produce un incremento moderado de la temperatura (2 a 3 °C

por cada 100 MPa), que a su vez depende de la temperatura inicial y de la velocidad de compresión del agua (Makita y col., 1991). Por otra parte, los cambios de estado del agua también se ven afectados, en especial la cristalización y fusión. Según el diagrama de fases del agua (Figura 1), ésta permanece líquida incluso a temperaturas bajo cero (-22 °C, 210 MPa) (Kalichevsky y col., 1995). Esto se explica ya que la presión impide el aumento de volumen que requiere la formación de cristales de hielo del tipo I, aunque hay otro tipo de cristales, de los tipos II a IX. La formación de estos últimos, debido a sus densidades (mayores que la del tipo I) y estructura molecular, se ve favorecida con la presión, además, los cristales del tipo VI y VII se forman incluso a temperatura ambiente (Deuchi y Hayashi, 1991; Cheftel y col., 2000). Este efecto podría aprovecharse para someter materiales biológicos y alimentos a temperaturas subcero, desde 0 a -20 °C, sin la formación de cristales de hielo (Cheftel y col., 2000).



**Figura 1:** Transiciones de fase del agua bajo presión. Diferentes estados de hielo I-IX (Kalichevsky y col., 1995).

**Tabla 10:** Compresibilidad del agua pura a diferentes presiones y temperaturas

Presión (MPa)	0 °C	50 °C	95 °C
<b>0.1</b>	<sup>a</sup> 0	0	0
<b>100</b>	4.3	3.7	3.9
<b>200</b>	7.5	6.7	7.1
<b>400</b>	12.1	11.1	11.6
<b>800</b>	—	16.9	17.5
<b>1000</b>	—	19	19.7

<sup>a</sup> Porcentaje (%) de compresibilidad.

Fuente: Tsiklis (1968).

- **Proteínas**

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de la presión en la estructura y las propiedades funcionales de las proteínas (Cheftel, 1995; Gross y Jaenicke, 1994; Mozhaev y col., 1994). En ellos se concluye, de forma general, que las modificaciones de las proteínas se deben a cambios en las interacciones intra e intermoleculares entre grupos funcionales de los aminoácidos. Ohmiya y col. (1989) resaltan efectos como el aumento de las interacciones hidrofóbicas a presiones de 300-400 MPa, debido a la alta compresibilidad del agua libre comparada con la de los puentes de hidrógeno. Por otra parte, los grupos sulfidrilo pueden oxidarse dando lugar a puentes disulfuro en presencia de oxígeno, aunque en muchos casos parece que este tipo de enlaces son los responsables de mantener la estructura de algunas proteínas debido a su gran estabilidad frente a la presión (Balny y Masson, 1993). En general, la aplicación de presiones superiores a 100-200 MPa a temperatura ambiente, provocan la disociación de macroestructuras en subunidades, así como, el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares, según el caso. Por otra parte, cuando la presión y concentración proteica es elevada, las interacciones antes mencionadas, causadas por las altas presiones, conducen a agregaciones y gelificaciones de los sistemas biológicos. En general, los efectos que sufren las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas pueden ser reversibles, aunque dependiendo de factores como la temperatura, pH y otros, pueden tener lugar de forma irreversible (Cheftel, 1995; Heremans, 1995).

A pesar de los aspectos generales mencionados anteriormente, existen otros factores, como la temperatura y composición del medio, que pueden hacer variar considerablemente los

resultados de la aplicación de las altas presiones (Kunugi y Tanaka, 1997; Van Camp y col., 1997).

En la leche, los fenómenos que ocurren en las caseínas se deben a cambios producidos en la estructura micelar y las consecuencias que de ellos se derivan. Diversos estudios (Gaucheron y col., 1997; Gill y col., 1997b; Law y col., 1998) muestran que la leche, al ser sometida a presión, sufre variaciones en el tamaño micelar. Así, presiones inferiores a 200 MPa apenas lo alteran, y entre 200 y 400 MPa se produce una parcial disgregación de la micela, aunque dependiendo de la temperatura de tratamiento puede producirse una reagregación. Presiones superiores a 400 MPa conducen a una desintegración micelar muy acusada, lo que provoca un incremento de la transmitancia de la leche (Payens y Heremans, 1969), un aumento de la caseína soluble en el suero (Law y col., 1998), así como un incremento en la relación superficie-volumen, que facilita las interacciones de las caseínas con otras sustancias del medio. Además, los parámetros de coagulación y firmeza de las cuajadas procedentes de leches presurizadas, también se ven modificados (Ferragut y Needs, 1997; Gill y col., 1997a).

Existen numerosos estudios (Felipe y Law, 1997; Felipe y col., 1997; Galazka y col., 1997) que evidencian diferencias de patrones de desnaturalización proteica entre los tratamientos térmicos y los de alta presión. Esto se ha puesto de manifiesto en las principales proteínas séricas, siendo la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), la proteína que mayor sensibilidad muestra a este tipo de tratamientos. En función de la presión, la  $\beta$ -Lg experimenta disociación del dímero, por lo que el monómero es susceptible de establecer nuevas interacciones. Así, éstas pueden tener lugar con la superficie de las micelas de caseína, puede producirse agregados entre varios monómeros de  $\beta$ -Lg, también puede darse la interacción con otros compuestos como glúcidos, o incluso se puede restablecer la estructura original del dímero (Iametti y col., 1997).

Dependiendo de los intervalos de presión aplicados, se han observado modificaciones en las propiedades funcionales de la  $\beta$ -Lg, como son la capacidad espumante y estabilidad de las espumas formadas, así como de la capacidad emulsionante (Pittia y col., 1996; Johnston y col., 1997). Estas modificaciones presentan buenas perspectivas de aplicación en la mejora de la calidad de alimentos y en la elaboración de nuevos productos. Otra posible utilidad, sería la aplicación de tratamientos de altas presiones para obtener calostros o leches maternas higiénicas, ya que el calor desnaturaliza fácilmente las inmunoglobulinas (Ig) (Law, 1995), mientras que con tratamientos de altas presiones se mantienen estables (Felipe y col., 1997).

- **Lípidos**

Diversos trabajos realizados en distintos alimentos (Buchheim y col., 1996; Cheftel, 1995; Dumay y col., 1996), ponen de manifiesto que la aplicación de las altas presiones provocan el aumento del punto de fusión de los lípidos, entre 10 y 15 °C por cada 100 MPa, aunque este fenómeno ocurre de forma reversible. En consecuencia las altas presiones favorecen la cristalización de los lípidos. Esta cristalización da lugar a la formación de estructuras más densas y estables que presentan un estado energético inferior. Por otro lado, mientras que en condiciones normales, a presión atmosférica, la temperatura de fusión de los lípidos depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada, ésta no influye bajo condiciones de presión (Heremans, 1995). Este fenómeno podría aprovecharse para la mejora de la estabilidad de alimentos grasos como la crema de cacao y chocolates, productos farmacéuticos y grasas cosméticas (Cheftel, 1992).

Un aspecto de gran interés es el relacionado con la cristalización de los fosfolípidos de las membranas biológicas, ya que este efecto es responsable de la inactivación de ciertos microorganismos (Heremans, 1992; Kanno y Uchimura, 1997).

Respecto a la degradación de los lípidos, parece que la alta presión incrementa la sensibilidad de éstos a la oxidación al igual que ocurre con el calor. Esto podría ser debido a la liberación de algunos metales, como el hierro, durante la desnaturalización de proteínas como la globina de la hemoglobina y mioglobina (Angsupanich y Ledwad, 1998; Cheah y Ledwad, 1996).

- **Hidratos de carbono**

Diferentes estudios realizados, ponen de manifiesto que los tratamientos de altas presiones apenas afectan a los hidratos de carbono de bajo peso molecular, pero sí se ven alteradas las características de gelificación de los polisacáridos como el almidón, carragenatos, pectinas, etc (Cheftel, 1992). Así, la aplicación de altas presiones a temperatura ambiente y baja temperatura pueden dar lugar a geles sin un tratamiento térmico previo (Hayashi y Hayashida, 1989). En función de la presión, temperatura y composición del medio se pueden obtener geles con una elasticidad, brillo, textura, firmeza y capacidad de retención de agua diferentes a los obtenidos mediante tratamientos térmicos (Gustin y col., 1997; Rubens y col., 1997). Una posible aplicación, resultaría de aplicar las altas presiones a polisacáridos para aumentar su accesibilidad frente a los enzimas (Miyama y col., 1992).

Respecto a la lactosa, los tratamientos térmicos pueden dar lugar a la isomerización a lactulosa, así como promover la reacción con las proteínas de la leche (reacción de Maillard)

provocando una disminución del valor nutritivo y un aumento de la alergenicidad de ciertas proteínas lácteas. En leches tratadas por alta presión no se ha detectado la formación de lactulosa, por lo que en este aspecto, la presurización de éstas también constituye una ventaja (López-Fandiño y col., 1996).

- **Enzimas**

Dada su naturaleza proteica, las modificaciones de las actividades enzimáticas pueden resumirse en los siguientes aspectos:

- El efecto de la presión puede ser reversible o irreversible y parcial o total, dependiendo del enzima, presión, temperatura y tiempo del tratamiento (Ogawa y col., 1990; Okamoto y col., 1991).
- La actividad enzimática puede verse incrementada o inhibida por la presión dependiendo de si dicha reacción conlleva un aumento o disminución del volumen (Asaka y Hayashi, 1991).
- Los substratos macromoleculares, tales como proteínas, almidones, etc., pueden modificarse por la presión, lo que puede suponer mayor o menor accesibilidad a los lugares de anclaje enzimáticos por simple aproximación física (Cheftel, 1995).
- El efecto mecánico de la presión sobre las membranas celulares de los tejidos o microorganismos, puede dar lugar a la salida de enzimas intracelulares, incrementándose su concentración y posibilidad de reacción con los substratos (Ohmori y col., 1991 y 1992).

- **Vitaminas**

Faltan aún más estudios que demuestren los efectos de las altas presiones sobre cada una de las vitaminas en cada alimento en particular, pero aún así, parece que, al contrario de lo que pasa en los tratamientos térmicos, las vitaminas son más resistentes a la presión. Este fenómeno es una de las características que más interés puede generar en los consumidores, y por tanto, de gran expectativa para las industrias (Kübel y col., 1997; Taoukis y col., 1998).

- **Equilibrio mineral**

Ya se ha comentado anteriormente que el incremento de la presión produce un aumento de la disgregación micelar. Este fenómeno contribuye al aumento del calcio y fósforo iónico, debido al aumento de la solubilidad de los complejos de calcio y fósforo coloidales, ligados a la micela. Por otro lado, dependiendo de la intensidad del tratamiento de

alta presión, estos desequilibrios minerales podrían ser reversibles. Respecto a las variaciones del pH, la mayoría de los autores que han estudiado este aspecto (Lee y col., 1996; Schrader y Buchheim, 1995; Schrader y Buchheim, 1997) no encontraron diferencias significativas respecto a los controles.

### 1.7.2.- EFECTO SOBRE LA MICROBIOTA

- **Células vegetativas**

Los mecanismos de inactivación bacteriana mediante las altas presiones podrían dividirse en cuatro grandes grupos:

- **Cambios en la morfología celular.** Se ha podido describir diferentes cambios morfológicos en las bacterias y sus estructuras internas, tales como, alargamiento de las bacterias, compresión de las vacuolas de gas, modificaciones en las estructuras reticulares del citoplasma, descenso del número de ribosomas, aparición de poros en la membrana del núcleo (en levaduras), separación de la doble capa lipídica de la membrana celular, así como de la pared celular, y salida de material intracelular al exterior (Knorr, 1995; Shimada y col., 1993).
- **Modificaciones en las reacciones bioquímicas.** Desnaturalización de proteínas y enzimas causando la inactivación de moléculas clave para la supervivencia de los microorganismos. Éstos se ven afectados de igual forma que las proteínas y enzimas de los compuestos alimentarios (inactivaciones parciales-totales y reversibles-irreversibles). También ha sido observado por diferentes autores fenómenos tales como, la inactivación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de las membranas y vacuolas celulares; inactivaciones de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa y Ca<sup>+2</sup>-ATPasa de la membrana celular; e inhibición de la biosíntesis proteica por disociación de los ribosomas (Abe y Horikoshi, 1997; Smelt, 1998).
- **Interferencias en los mecanismos genéticos.** A diferencia de las proteínas, los ácidos nucleicos son más resistentes a la presión, probablemente por el gran número de puentes de hidrógeno intramoleculares que presenta la molécula del ADN, pudiendo conservar la estructura nativa del ADN con tratamientos de 1000 MPa a 40 °C durante 1 hora (Hoover y col., 1989). Sin embargo, diferentes estudios muestran que ocurren alteraciones en la estructura del ADN, ya que aparecen zonas fibrilares y más densas. La aplicación de la alta presión también le afecta por inactivación de ciertos enzimas encargados de reparar el ADN y ARN,

en la transcripción, traducción y translación (Chilton y col., 1997; Isaacs y col., 1995).

- **Efectos en la membrana y pared celular.** En general, las altas presiones provocan un malfuncionamiento de la membrana por alteraciones en su permeabilidad. Las modificaciones producidas son debidas a desnaturalizaciones de proteínas de la membrana y enzimas clave como la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  (MacDonald, 1992; Smelt, 1993). Otro factor que afecta a la permeabilidad de la membrana, es su composición propiamente dicha. Así, las membranas más rígidas son más susceptibles a la presión. Por otro lado, según la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana, ésta puede presentar unas condiciones de cristalización determinadas que podría facilitar la formación de cristales produciendo pequeñas fisuras, que serían las responsables del intercambio de sustancias entre el interior y exterior de la célula, con el consecuente daño celular. (Ludwig y Schreck, 1997; Russell y col., 1995).

Otros factores que intervienen en la supervivencia de los microorganismos tratados con altas presiones son:

- **Tipo de microorganismo.** Por lo general, se acepta que los microorganismos Gram (+) son más resistentes que los Gram (-), los hongos filamentosos y las levaduras se inactivan muy fácilmente, y las formas vegetativas son más sensibles que las formas esporuladas. A su vez, la morfología parece desempeñar un papel importante, siendo las formas esféricas las más resistentes, las formas intermedias coco-bacilos cortos presentan sensibilidad variable y las formas de bacilo son las más sensibles a la presión. Otra observación, no menos importante, es que los microorganismos con igual característica de Gram e igual o similar morfología, pero de especies diferentes, presentan diferentes sensibilidades a la presión (Patterson y Kilpatrick, 1998; Patterson y col., 1995; Trujillo y col., 1997).
- **Selección natural de resistentes mediante ciclos sucesivos.** La resistencia de los microorganismos puede ser diferente si se trata de cepas que han sido presurizadas anteriormente y sobrevivieron, ya que mediante un mecanismo de selección natural de las cepas resistentes (mutantes) se podrían obtener cepas muy resistentes a las altas presiones (Fuji y col., 1997; Hauben y col., 1997).
- **Estado fisiológico de los microorganismos.** Los microorganismos cuando se encuentran en la fase de crecimiento son más sensibles a los tratamientos de alta

presión que en la fase estacionaria, de forma que podrían coexistir en un mismo medio microorganismos en diferentes fases de crecimiento, pudiéndose obtener diferentes cinéticas y valores de destrucción al presurizar (Earnshaw, 1995; Mackey y col., 1995).

- **Combinaciones del tratamiento de alta presión (P, T<sup>a</sup>, t).** Podrían estudiarse como afectan *per se* las variables que intervienen en el proceso de presurización (presión, temperatura y tiempo), sobre la inactivación bacteriana, aunque realmente, es la combinación de éstas la que determina el efecto final en los microorganismos.

Así pues, generalizando, a medida que se incrementa la presión hay un aumento de la destrucción bacteriana, aunque en algunas poblaciones en donde se producen mutaciones (bacterias barorresistentes), a partir de una determinada magnitud de presión no se observa mayor inactivación.

Respecto a la temperatura del tratamiento, se observan fenómenos muy interesantes, ya que presurizaciones a bajas temperaturas, incluso subcero, pueden producir reducciones bacterianas de igual magnitud que a moderada y altas temperaturas. Así pues, normalmente la inactivación bacteriana no sigue cinéticas de primer orden respecto a la temperatura.

En cuanto al tiempo de aplicación, al igual que ocurre con la presión, por lo general, a medida que se incrementa éste, se produce mayor inactivación bacteriana. Sin embargo, parece constatarse que la máxima eficacia se encuentra entre los primeros 20 minutos de tratamiento, a partir de los cuales, el efecto del tiempo es cada vez menor.

Factores como el número de tratamientos, el tipo de tratamiento (en continuo o en ciclos) y la velocidad de presurización y despresurización, también desempeñan un papel importante en la destrucción bacteriana.

Diferentes estudios corroboran los fenómenos anteriormente expuestos (Capellas y col., 1996; Cheftel y Culioli, 1997; Ponce y col., 1998; Sojka y Ludwig, 1994).

- **La composición del medio.** Numerosos estudios han tratado de averiguar el efecto que provoca el tipo y concentración de los diferentes componentes que podemos encontrar en los alimentos. Sería difícil generalizar si un componente ejerce protección, o por el contrario, aumenta la destrucción bacteriana bajo presión, ya que dependiendo de su concentración, podría actuar de una forma u

otra. Junto con la composición, el efecto de la modificación del pH del medio, parece tener un efecto letal importante para los microorganismos. Además de la composición y del pH del alimento, diversos autores han remarcado el efecto que ejerce la estructura del alimento sobre la inactivación bacteriana (Oxen y Knorr, 1993; Popper y Knorr, 1990; Simpson y Gilmour, 1997).

- **Esporas bacterianas**

Al igual que las células vegetativas, la sensibilidad de las esporas varía enormemente en función de la cepa bacteriana y el resto de factores que influyen a las formas vegetativas. Sin embargo, las esporas son más resistentes, ya que pueden sobrevivir a presiones de 1000 MPa cuando la temperatura del tratamiento no supera los 45-50 °C (Gould, 1995).

Debido a la dificultad que conlleva inactivar formas esporuladas, diversos autores propusieron utilizar tratamientos específicos de presurización con bajas presiones durante largos períodos de tiempo, para provocar la germinación de las esporas y, seguidamente, aplicar un tratamiento de altas presiones corto pero intenso, para inactivar las formas vegetativas germinadas. También la combinación de ciertas sustancias como  $\text{CaCl}_2$  o etanol, o la aplicación que temperaturas elevadas en los tratamientos de alta presión, parecen bastante efectivas para inactivar las formas vegetativas o en su defecto las esporas (Capellas, 1998; Heinz y Knorr, 1998; Hölters y col., 1997; Wuytack y col., 1997).

- **Virus**

Los virus, por lo general, presentan una resistencia muy elevada a los tratamientos de alta presión. A presiones entre 600 y 1600 MPa se han observado alteraciones en las estructuras virales (Silva y Weber, 1988). Sin embargo, otros tipos de virus más complejos, que necesitan de una cubierta o alguna estructura proteica para sobrevivir, se han podido inactivar, total o parcialmente, a presiones inferiores (Butz y col., 1992; Da Poian y col., 1993). Ciertos estudios han mostrado que se pueden obtener vacunas a partir de los virus con cubiertas que han sido tratados por altas presiones. Al presurizar se disminuye o elimina su infectividad, pero conservan su potencial inmunológico, lo que permite elaborar vacunas (Pontes y col., 1997; Silva y col., 1992).

- **Parásitos**

Tratamientos de altas presiones moderados, entre 100 y 200 MPa, a temperaturas ambiente y tiempos relativamente cortos (10-20 min.), han conseguido inactivar diferentes parásitos presentes en los alimentos, tales como huevos de mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*), larvas de *Trichinella spiralis* en músculos infectados, así como tenias y tremátodos (Butz y Tauscher, 1995; Ohnishi y col., 1993).

### 1.7.3.- TECNOLOGÍA Y EQUIPOS

Los equipos de altas presiones normalmente se componen de un recipiente o cilindro donde se aloja el alimento mientras se está presurizando, un sistema de bombas o generadores de presión, un sistema de regulación de la temperatura del tratamiento y adicionalmente, algunos equipos incorporan un sistema de carga y recogida aséptica del alimento (Figura 2).

El recipiente de presurización, generalmente cilíndrico, puede tener combinaciones de diámetros y alturas muy variadas. Está fabricado de materiales muy resistentes a la presión, cuyo grosor depende del volumen y de la presión máxima que alcance el equipo. Hoy en día, uno de los puntos críticos de estos equipos son los sistemas de cierre, ya que al igual que el recipiente, deben soportar elevadas presiones y al existir una zona de discontinuidad de materiales, necesita de complejas combinaciones de juntas que se adapten y cierren perfectamente a tan altas presiones. Principalmente se fabrican tres tipos de cierre: cierre de rosca, los cuales son de apertura y cierre rápidos, ideales cuando se necesita procesar muestras frecuentemente con tiempos cortos, aunque son caros; cierre continuo, que son más económicos pero requieren más tiempo para su apertura y cierre; cierre de tambor, los cuales ocupan más espacio que los anteriores, son lentos al actuar y más caros, solo se utilizan cuando por motivos técnicos no se pueden utilizar los sistemas de cierre anteriores (Mertens, 1995).

En función de los sistemas de generación de presión, podemos contar con sistemas directos e indirectos. En los sistemas directos el generador de presión se halla en el interior del recinto de presión. Son poco utilizados debido al desgaste que sufren las superficies de contacto. En los sistemas indirectos el generador de presión se halla fuera del recinto de presión, siendo el fluido transmisor de la misma, agua en combinación de pequeñas cantidades de aceite lubricante (para las partes móviles) y de anticongelantes a proporciones variables para poder trabajar a temperaturas bajo cero. A su vez, estos sistemas pueden ser discontinuos o semicontinuos. En los sistemas discontinuos, el alimento líquido o sólido debe

estar envasado para no mezclarse con el fluido transmisor de presión en el cilindro, ya que ambos se hallan en un único compartimento. En los sistemas semicontinuos, sólo para líquidos, no se necesita envasar previamente, ya que en el interior del cilindro coexisten dos compartimentos, uno para el fluido transmisor de presión y otro para el alimento, separados por un pistón flotante que mediante un juego de válvulas y contrapresiones se capta el alimento, se presuriza y se expulsa del cilindro. En estos sistemas, el alimento tras ser tratado debe envasarse o conservarse de forma aséptica para prevenir recontaminaciones (Mertens, 1995).

El control de la temperatura en estos equipos es necesario para poder presurizar a temperaturas diferentes de la ambiente, y así poder contrarrestar los efectos del aumento de temperatura adiabática por la presión y para mantener constante la temperatura durante todo el proceso de presurización. Hay sistemas externos de regulación de temperatura, que calientan o refrigeran un fluido transmisor que circula alrededor del cilindro; también pueden haber resistencias eléctricas que calientan directamente la pared del cilindro, estos son sistemas baratos y prácticos sólo si no se realizan muchos cambios de temperatura en cortos plazos ya que son lentos. Los sistemas de regulación de temperatura internos, al igual que los externos, calientan o refrigeran un fluido transmisor, aunque éste circula por el interior del cilindro o a través del interior de una camisa en forma de serpentín, son sistemas más caros pero tienen mayor eficacia a la hora de regular y alcanzar la temperatura deseada (Mertens, 1995).

Como complemento a los equipos discontinuos, cabe destacar que el tipo de envase a utilizar debe tener un sistema de cierre hermético y han de tener la capacidad de ser envases flexibles para poder absorber la deformación que sufren al comprimirse los alimentos bajo presión. Otro aspecto a tener en cuenta y que actualmente está en estudio es que el material de los envases no sufra migraciones de sus componentes al alimento y que no pierda características tales como la permeabilidad al oxígeno, vapor, etc., durante y después de la presurización (Mertens, 1993).

#### **1.7.4.- ANTECEDENTES EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS**

Desde la década de los 80, se han realizado numerosos estudios de forma sistemática, a medida que diferentes programas de investigación han financiado estos estudios en todo el mundo.

El principal objetivo del estudio en la aplicación de las altas presiones, ha sido sin duda, conseguir alimentos que no entrañen ningún riesgo para la salud desde el punto de vista

higiénico-sanitario. De ahí, que hayan sido numerosos los estudios de inactivación microbiana.

Styles y col. (1991), mostraron la destrucción de patógenos como *Listeria monocytogenes* en leche cruda y UHT, consiguiendo reducciones de hasta 5 y 6 unidades logarítmicas. Isaacs y col. (1995) estudió la destrucción que sufría *Escherichia coli* en leche cruda. Patterson y col. (1995) observaron un cierto efecto protector de la leche UHT frente a soluciones tampón fosfato pH 7, con microorganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. López-Fandiño y col. (1996) observaron considerables reducciones de la microbiota psicrótrufa (a 400 MPa) en leche cruda, mientras que en las bacterias aerobias mesófilas la inactivación fue considerablemente inferior en condiciones similares. Mussa y Ramaswamy (1996) consiguieron prolongar la vida útil de la leche tras ser sometida a presiones entre 200 y 400 MPa, reduciendo su microbiota natural con mínimos cambios en color y viscosidad. En leche de cabra entera y cruda, Trujillo y col. (1999) obtuvieron unos resultados, de recuentos totales y enterobacterias, parecidos a los recuentos en una leche pasteurizada, cuando ésta es sometida a tratamientos de 500 MPa a 20 °C durante 15 min. Otros estudios realizados en leche de vaca, en los que también se obtuvieron reducciones importantes de la microbiota, son los realizados por Rademacher y Kessler (1997) y Sionneau y col. (1997).

Tonello y col. (1992) trabajaron con calostro bovino entero y desnatado obteniendo considerables reducciones de la microbiota aerobia mesófila y coliformes totales, además observaron un cierto efecto baroprotector del calostro entero. Raffalli y col. (1994) estudiaron la inactivación de *Listeria innocua* en nata líquida (35% materia grasa), obteniendo reducciones de entre 2 y 4 unidades logarítmicas. Tanaka y Hatanaka (1992 y 1993) estudiaron los efectos de las altas presiones en el yogur, observando que se prevenía la acidificación post-ensado, aún manteniéndose la microbiota ácido-láctica, a la vez observaron que la textura se mantenía con los tratamientos aplicados.

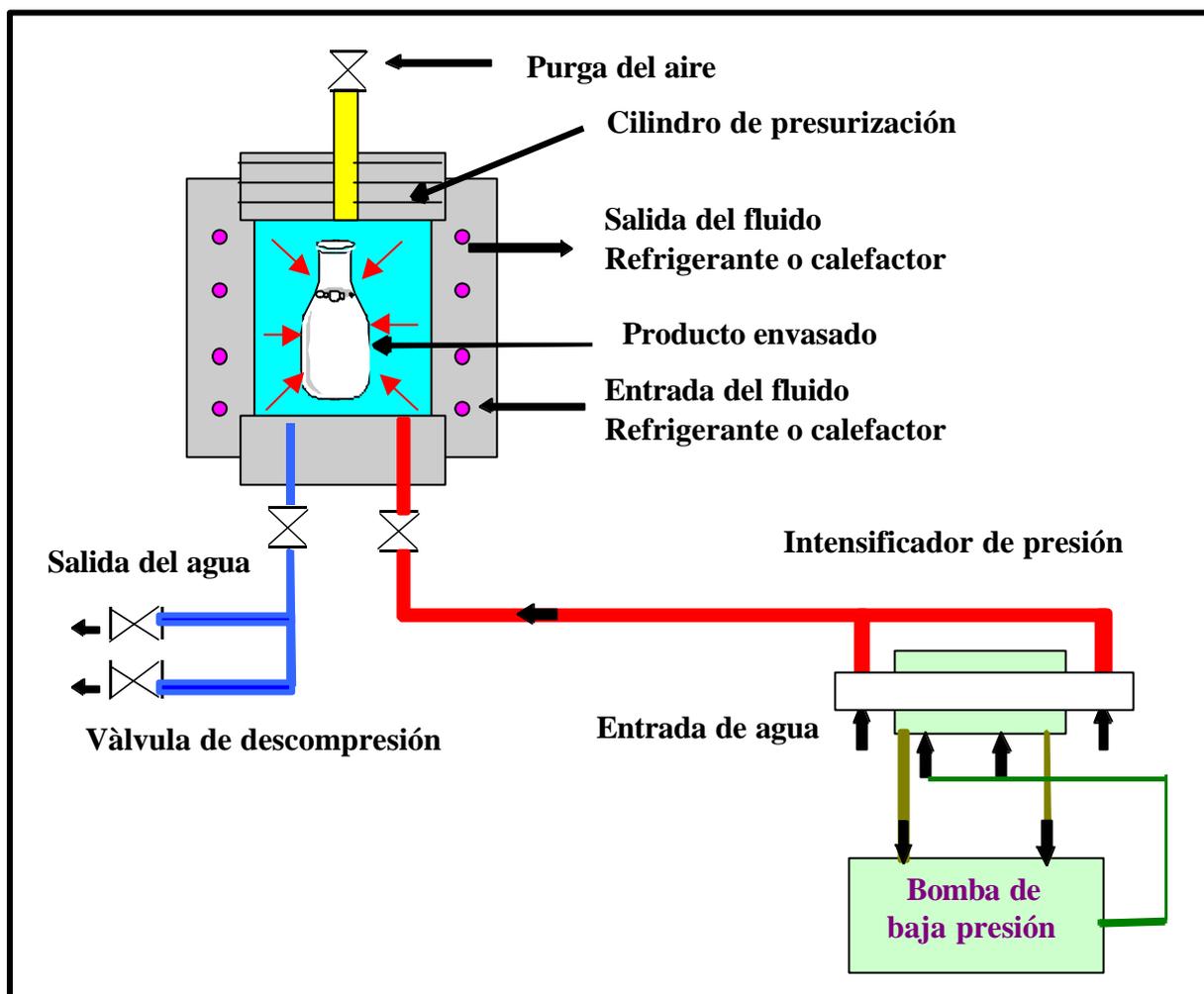
Szczawinski y col. (1996) consiguen reducir la población de *Listeria monocytogenes* inoculada en queso loncheado. Reys y col. (1997) también consiguen reducciones de diferentes microorganismos en queso. Además, observan que la aplicación de tratamientos cíclicos aumenta la destrucción de la microbiota.

Yokohama y col. (1993) propone el uso de las altas presiones para conseguir una maduración acelerada de los quesos. Según su estudio, consiguieron acelerar la maduración de 6 meses a 3 días en queso Cheddar. También Jin y Harper (1996) realizaron experimentos para la maduración acelerada y el desarrollo de aromas en queso suizo. Siguiendo con los

estudios en quesos, Messens y Huyghebaert (1996 y 1997) estudiaron la utilización de las altas presiones para la aceleración del salado de queso, aunque no obtuvieron resultados muy satisfactorios.

Los estudios realizados por Torres-Mora y col. (1996) proponen el uso de las altas presiones para obtener quesos con texturas más uniformes y homogéneas y la posibilidad de generar texturas diferentes. Así mismo, Reys y col. (1997) obtuvieron modificaciones de la textura de quesos, además de obtener una mejora en las características organolépticas de los quesos.

Por otro lado, Trujillo (1996) manifestó la utilidad de usar las altas presiones para la obtención de “cuajadas modelo” libres de microbiota láctica, para estudiar posteriormente los procesos de proteólisis debida a la plasmina, ya que ésta no se vio afectada por presurizaciones de 400 MPa a 20 °C durante 10 min.



**Figura 2:** Esquema del equipo de alta presión instalado en la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos, Universitat Autònoma de Barcelona (por cortesía de ACB-GEC ALSTHOM, Nantes, Francia).

- Equipo con cierre de rosca.
- Sistema generador de presión indirecto.
- Sistema de presurización en discontinuo.
- Sistema de regulación de la temperatura (del fluido transmisor) externo, a través de la camisa del cilindro en forma de espiral.

## **2. OBETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

## OBJETIVOS

### ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

En el presente trabajo el objetivo general fue evaluar el efecto de las altas presiones hidrostáticas en diferentes cepas microbianas de interés sanitario y tecnológico (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus*) inoculadas en leche de oveja. Para la consecución del mismo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

Estudio del efecto de las variables presión, temperatura, tiempo y composición del medio sobre cada uno de los microorganismos inoculados, así como, el análisis estadístico de la importancia específica (valor  $F$ ) que representa cada una de las variables en la variabilidad total del modelo y para cada uno de los microorganismos estudiados.

Determinación de las cinéticas de destrucción bacteriana y el cálculo de los valores  $D$  a diferentes combinaciones de presión y temperatura en los microorganismos inoculados.

Determinación de los tratamientos capaces de alcanzar niveles importantes de destrucción microbiana (superiores a  $10^5$  ufc/ml) en los microorganismos inoculados.

Estudio de la sensibilidad a los tratamientos de alta presión que ejerce la leche de oveja *per se*, así como, su efecto respecto al contenido en materia grasa.

### ASPECTOS FISICOQUÍMICOS

El objetivo general de este apartado se centró en el efecto de las altas presiones sobre la fracción lipídica de la leche, el cual se planteó a través de los siguientes objetivos específicos:

Estudio de las modificaciones sobre el diámetro y distribución del tamaño de los glóbulos grasos de la leche, para poder establecer qué tratamientos son los adecuados para el mantenimiento de la estabilidad, respecto a la fase grasa de la leche.

Determinación de los posibles efectos en la lipólisis inducida a causa de los tratamientos de alta presión.

Determinar los posibles cambios en el color de la leche por el efecto de los tratamientos de altas presiones.

PLAN DE TRABAJO

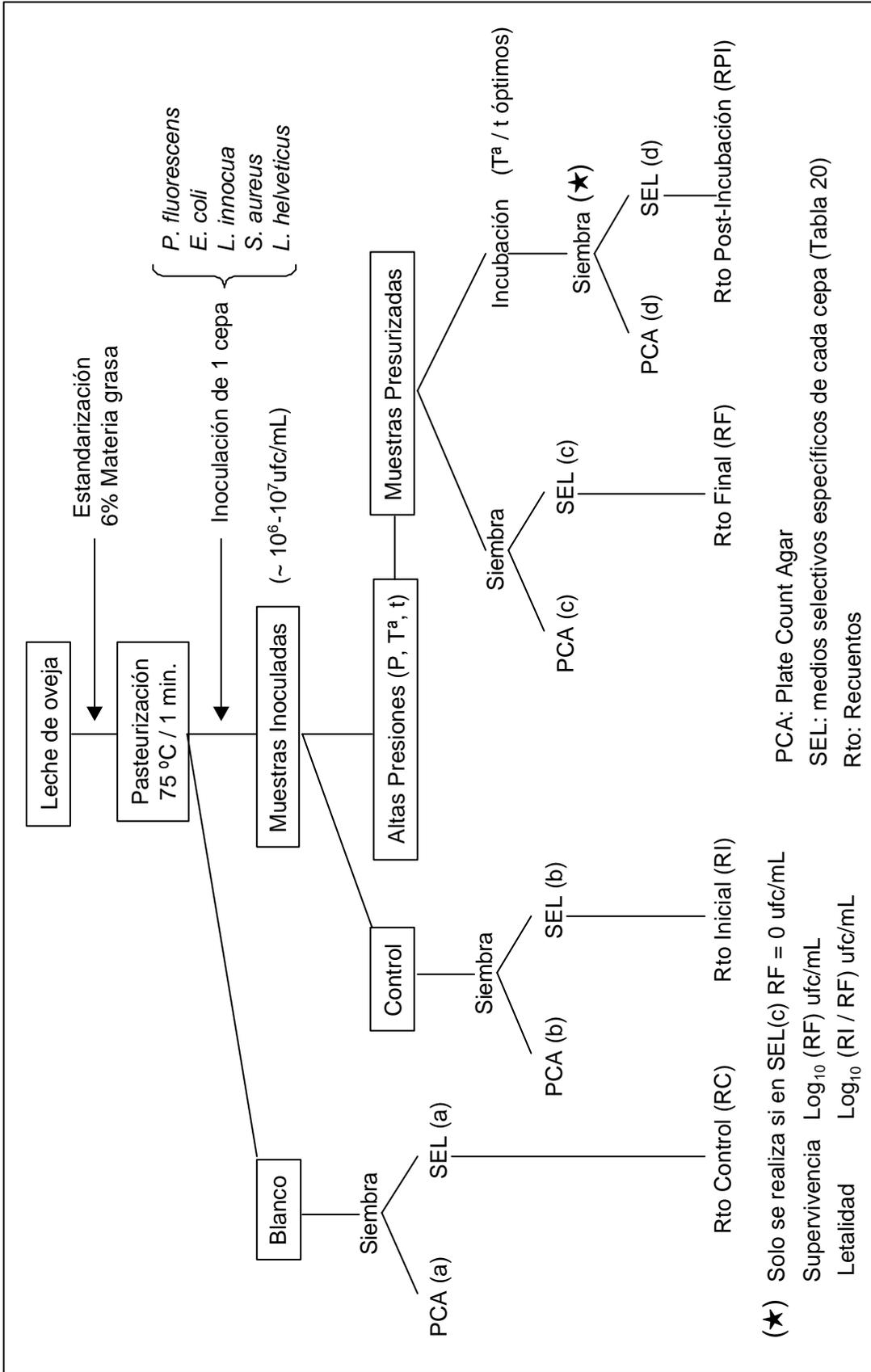


Figura 3: Plan de trabajo en los ensayos microbiológicos

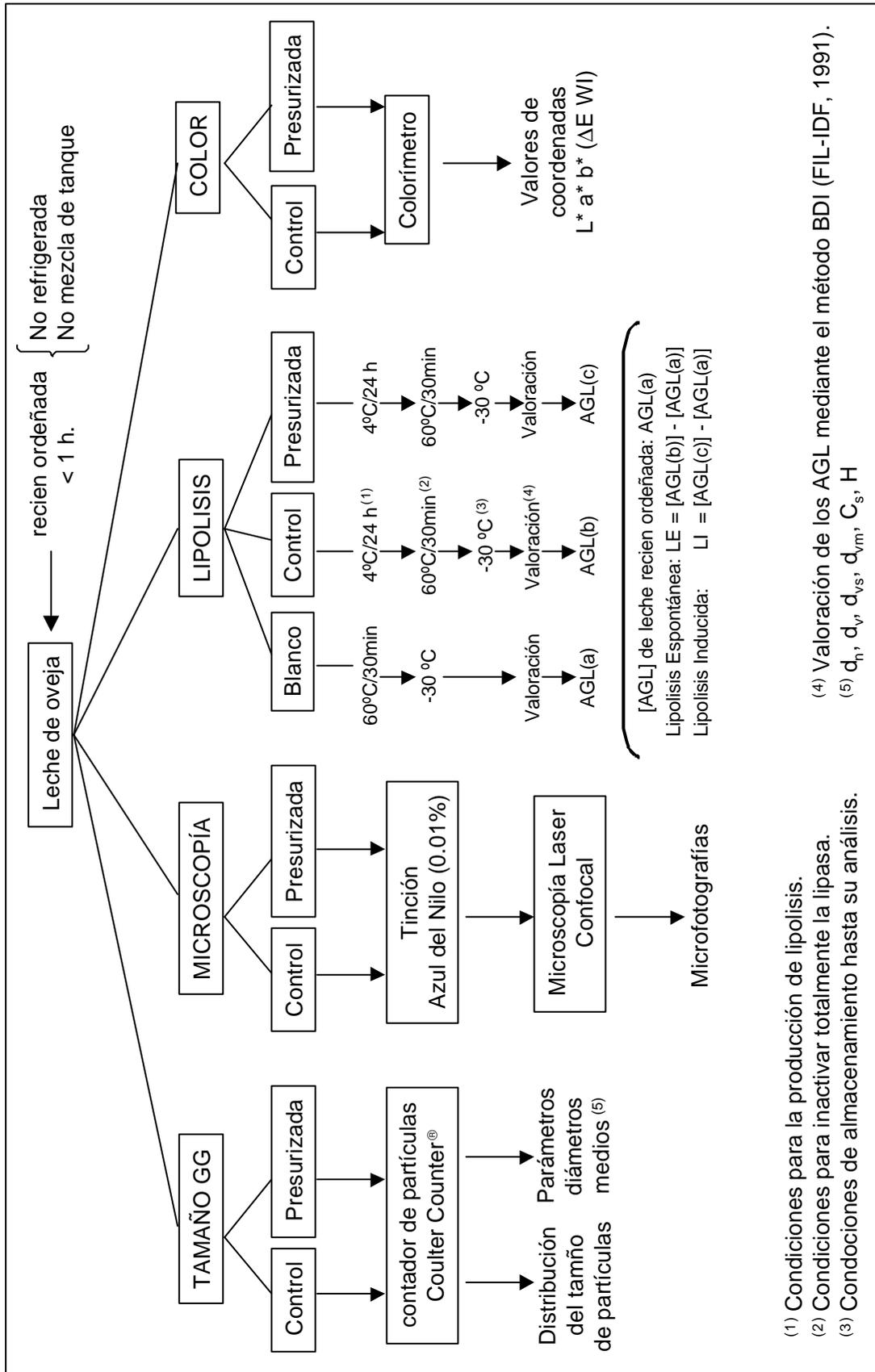


Figura 4: Plan de trabajo en los ensayos fisicoquímicos.