

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

La aplicación de las altas presiones en la leche de oveja presentó un comportamiento que, en general, condujo a un incremento de la destrucción microbiana a medida que se incrementó la presión aplicada en los tratamientos (Tabla 11). No obstante, este incremento de la letalidad no ocurrió de forma gradual entre 0.1 y 500 MPa y en cada microorganismo fue diferente. Fue necesaria la aplicación de presiones de 300 MPa en *Pseudomonas fluorescens*, 400 MPa en *Escherichia coli* y *Listeria innocua* y 500 MPa en *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus* para obtener reducciones microbianas considerables, igual o superiores a 3 unidades logarítmicas (Figura 5, 6, 7 y 8).

La sensibilidad que manifestaron los microorganismos estudiados frente a la presión resultó muy diferente. *Pseudomonas fluorescens* fue, con diferencia, el microorganismo más sensible a la presión. *Escherichia coli* y *Listeria innocua* mostraron una sensibilidad intermedia en función del resto de variables del tratamiento, mientras que *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus* mostraron gran resistencia a la presión. Sin embargo, de forma significativa ($P < 0.05$), *Staphylococcus aureus* resultó ser el microorganismo más resistente a la presión de los estudiados, aspecto que ha sido constatado por otros autores (Shigehisa y col., 1991; Takahashi, 1992).

Presiones inferiores a 200 MPa resultaron insuficientes en la mayoría de los microorganismos estudiados, con cualquiera de las combinaciones de tratamientos ensayados en leche de oveja 6% MG, a excepción de *Pseudomonas fluorescens* que a 200 MPa / 50 °C presentó una reducción superior a 3 unidades logarítmicas; entre los 200 y 300 MPa a 2, 10 y 25 °C, se alcanzaron reducciones entre 2 y 6 unidades logarítmicas o destrucción total de ésta (superior o igual a 7.3 unidades logarítmicas) con 300 MPa a 50 °C. Hay que destacar que a 300 MPa, *Escherichia coli* y *Listeria innocua* presentaron reducciones entre 2 y 3 unidades logarítmicas (excepto *Listeria innocua* a 25 °C, inferior a 1 unidad logarítmica) y superior a 6 unidades logarítmicas a 50 °C. Fue necesario alcanzar presiones de 400 MPa para obtener mayor efectividad en la inactivación mediante los tratamientos de alta presión, en la mayoría de los microorganismos estudiados. Con la aplicación de estas presiones, se obtuvieron reducciones microbianas igual o superiores a 5 unidades logarítmicas para *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Listeria innocua* (excepto en *Escherichia coli* a 2 °C y *Listeria innocua* a 25 °C, con reducciones entre 4 y 5 unidades logarítmicas). Finalmente, a 500 MPa, en la mayoría de los microorganismos estudiados se alcanzaron reducciones igual o superiores

a 5 unidades logarítmicas, a excepción de *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus* con reducciones de entre 3 a 7 unidades logarítmicas.

La variable temperatura presentó un efecto de destrucción bacteriana no lineal, a diferencia del presentado por la variable presión. Así como muestra la figura 9, dependiendo de la presión aplicada, la curva de inactivación bacteriana mostró un punto de inflexión a una diferente temperatura para cada microorganismo estudiado.

Como resultado del estudio de todas las combinaciones de los tratamientos de alta presión, el análisis estadístico mostró que las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* y *Lactobacillus helveticus* fueron más resistentes a los tratamientos realizados a temperatura ambiente (25 °C) ($P < 0.05$), mientras que las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* lo fueron a los tratamientos a bajas temperaturas (2 y 10 °C) ($P < 0.05$). No obstante, los tratamientos realizados a 50 °C (temperatura moderadamente alta) mostraron ser los más eficaces ($P < 0.05$) en todos los microorganismos estudiados (Tabla 12).

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, hay estudios (Takahashi, 1992) que concluyen que *Escherichia coli* presenta una mayor reducción a baja temperatura (-20 °C) que a temperatura ambiente (20 °C). Esta mayor destrucción podría explicarse por el daño que provoca en la membrana celular de los microorganismos la formación de cristales de hielo (Kalichevsky y col., 1995) (Figura 1), así como, la disminución de la fluidez de la membrana celular por la cristalización de los fosfolípidos de ésta. Por otro lado, a consecuencia del efecto de la congelación, se produce un aumento de la concentración de las sustancias que componen el medio tratado por altas presiones, las cuales, dependiendo de su naturaleza, podrían tener una actividad antimicrobiana.

Al igual que la variable presión, el tiempo de aplicación del tratamiento presentó una cinética de destrucción bacteriana de primer orden, al menos en los 15 primeros minutos de tratamiento (Figura 11 y 12). A medida que se incrementó el tiempo de tratamiento, se observó una mayor reducción microbiana. Del análisis estadístico de la variable tiempo se desprende que para todos los microorganismos estudiados hubieron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tiempos 5, 10 y 15 min. de tratamiento (Tabla 13).

Con objeto de estudiar el comportamiento de los microorganismos en tratamientos más largos, se realizaron ensayos con determinadas combinaciones de presión y temperatura a intervalos de 5 minutos hasta 1 hora (0, 5, 10, 15, 20,, 50, 55, y 60 min.). De aquí se obtuvieron las ecuaciones que nos permitieron calcular las cinéticas de destrucción microbiana. Dichas ecuaciones fueron de primer orden, en las que por analogía con los

tratamientos térmicos, se pudo hallar el tiempo de reducción decimal (valor *D*) (Tabla 17). El valor *D* puede ser muy útil a la hora de comparar la efectividad entre diferentes tratamientos de alta presión con el mismo o entre distintos microorganismos, así como para comparar tratamientos de alta presión con otros tratamientos convencionales como los térmicos.

Nuevamente, en función de los valores *D* obtenidos, se volvió a evidenciar la diferente sensibilidad mostrada por los microorganismos a los tratamientos de alta presión (Tabla 17). Ésta coincidió con la mostrada frente a la variable presión: sensibilidad alta para *Pseudomonas fluorescens*, media para *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, media baja para *Lactobacillus helveticus* y baja o muy baja para *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, se pudo observar que el mayor descenso de la población bacteriana ocurrió durante los 15 o 20 primeros minutos del tratamiento (Figura 10). A medida que se incrementó el tiempo de exposición al tratamiento de alta presión, la pendiente de la recta fue disminuyendo, en algunos microorganismos, pasando de una cinética de destrucción de 1^{er} orden a una de 2^o orden. En algunos casos, cierto número de la población bacteriana sobrevivió, aunque el tratamiento de alta presión se prolongó a tiempos en los que teóricamente debería haber ocurrido una destrucción total. Este fenómeno ha sido ya observado de forma repetida en otros microorganismos Gram (+) (Earnshaw, 1995). Hay varias razones que explican el cambio de la pendiente en la cinética de destrucción. Es posible que una subpoblación sensible a los tratamientos de alta presión descienda rápidamente en los primeros 5 min., aunque lo más probable es que cierto número de la población sobreviva debido a mecanismos de adaptación al medio durante el proceso de alta presión. Este comportamiento se observa a partir de tratamientos superiores a 20 min. Este supuesto tiempo de adaptación concuerda con el período que sería necesario para la adaptación de la síntesis proteica y la modificación del estado fisiológico de algunos microorganismos (Earnshaw, 1995). Dicho fenómeno de selección natural podría ser interesante si se quisiera obtener una cepa microbiana barorresistente.

A nivel práctico no resultó efectivo prolongar un tratamiento de alta presión más allá de los 15 o 20 min. De forma generalizada, se pudo observar que en función del tratamiento y tipo de microorganismo, al incrementar el doble la presión de un tratamiento se obtuvieron valores *D* inferiores a la mitad. Así por ejemplo, en el tratamiento de *Escherichia coli* a 50 °C, al incrementar el doble la presión, de 150 a 300 MPa, ésta provocó un descenso del valor *D* de 18.8 a 2.53 min., por lo tanto, se produjo un aumento de la eficacia del tratamiento en más de 7 veces (Tabla 17).

El efecto de la composición del medio, en el que tuvo lugar la aplicación de las altas presiones sobre los microorganismos, se vio claramente influido por factores como el tipo de microorganismo, la magnitud de la presión y la temperatura a la que se realizó el tratamiento (Figura 13, 14 y 15).

En todos los tratamientos se pudo observar el efecto baroprotector de la leche de oveja *per se*, ya que en todas las combinaciones, el análisis estadístico mostró que cuando el medio de tratamiento de los microorganismos fue en Solución Ringer (SR) se alcanzó una mayor letalidad que cuando se realizó en leche de oveja (0, 6, 50% de materia grasa) ($P < 0.05$) (Tabla 14).

Por otra parte, del análisis estadístico se pudo observar que hubo 4 tipos de comportamientos diferentes frente al contenido en materia grasa (**MG**) de la leche según el microorganismo tratado: en *Escherichia coli*, el contenido de MG no mostró influencia en la baroprotección; en *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus*, la MG *per se* ejerció baroprotección, sin afectar el contenido de ésta; en *Listeria innocua*, la MG además de ejercer baroprotección, esta protección fue mayor a medida que se incrementó su contenido; y en *Pseudomonas fluorescens*, la MG ofreció baroprotección (6% MG), pero al aumentar el contenido de ésta al 50%, pareció cambiar su efecto, incrementando la letalidad frente a dicho microorganismo (Tabla 14).

Además de las tendencias que se observaron estadísticamente, en combinación de todas las variables estudiadas para cada microorganismo, también se pudo comprobar que el efecto que ejerce el contenido en MG, para un mismo microorganismo, varió en función de la temperatura del tratamiento de alta presión. Así pues, por ejemplo, en el caso de *Staphylococcus aureus*, a temperatura ambiente (25 °C / 400 MPa), el aumento del contenido de MG de la leche al 50% no influyó en su letalidad ($P > 0.05$), mientras que ese aumento a bajas temperaturas (4 °C / 400 MPa), provocó un ligero descenso en la letalidad de éste, aunque de forma significativa ($P < 0.05$). Por el contrario, en el caso de *Escherichia coli*, la letalidad se vio incrementada ligeramente ($P < 0.05$) cuando se aumentó el contenido en MG del 6 al 50%, si se comparan los tratamientos de 25 °C / 400 MPa y 4 °C / 400 MPa.

Al parecer, el efecto global del contenido en MG sobre los microorganismos fue la suma de dos efectos contrapuestos. Por una parte, el efecto protector de la grasa, se explicaría considerando que la grasa podría absorber la energía que supone la aplicación de la presión, evitando el intercambio de sustancias hidrosolubles entre el medio y el interior de los microorganismos. Por otro lado, la manifestación del efecto letal de la materia grasa para los microorganismos, podría deberse al aumento de la concentración de ciertas sustancias

liposolubles con actividad antimicrobiana (Bogh-Sorensen, 1994). Durante la presurización, habría un intercambio de lípidos de la leche con las lipoproteínas de la membrana de los microorganismos con la consiguiente alteración de la composición y la permeabilidad de ésta. A estos efectos mencionados se podría sumar un efecto físico de destrucción bacteriana que resultaría del incremento en la rigidez de la membrana por cristalización lipídica, dependiendo de la presión y temperatura de tratamiento.

Al igual que se ha observado en otros estudios (Oxen y Knorr, 1993), los tratamientos de alta presión a 50 °C ejercen un efecto destructivo sinérgico, ya que al efecto de la presión hay que añadir el efecto térmico, que provoca los cambios en la fluidez de la membrana de los microorganismos (Knorr, 1995), permitiendo un mayor intercambio entre sustancias extra e intracelulares.

Por otra parte, los posibles cambios de pH que se pueden generar durante el tratamiento de alta presión en el alimento, están influenciados a su vez, por el pH inicial y la composición del medio (Heremans, 1995). Según Chong y col. (1985), pequeños cambios en el pH del medio provocan un efecto letal sinérgico con la alta presión que sobre todo se da a temperaturas de tratamiento moderadamente altas así como a bajas temperaturas. Por una parte, la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa y bomba H^+ ATPasa es reducida por la presión, lo que conlleva cambios de pH y el aumento de la concentración de componentes del medio. Por otra parte, ya se ha comentado que los tratamientos de alta presión a bajas temperaturas provocan la aparición de cristales que pueden dañar la membrana celular de los microorganismos, de la misma forma que los tratamientos a temperaturas moderadamente altas pueden aumentar en exceso la fluidez de la membrana de éstos. Estos fenómenos junto con la pérdida de actividad de los enzimas encargados de regular el pH y la presión osmótica podrían explicar el efecto cooperativo que poseen los tratamientos de alta presión cuando se producen pequeñas modificaciones de pH (Smelt, 1993).

A modo de resumen, el efecto que provocó la composición del medio (SR y leche de oveja: 0, 6 o 50% MG) sobre la letalidad, volvió a confirmar estadísticamente ($P < 0.05$) el mismo orden de barorresistencia entre los microorganismos estudiados, que se observó con la variable presión y los valores D , más sensibles: *Pseudomonas fluorescens* < *Escherichia coli* ≈ *Listeria innocua* < *Lactobacillus helveticus* < *Staphylococcus aureus*, ($P < 0.05$). En la mayoría de los microorganismos estudiados, excepto en *L. helveticus*, la variable presión fue la que afectó en mayor grado a la letalidad de éstos ($P < 0.05$) (Tabla 15).

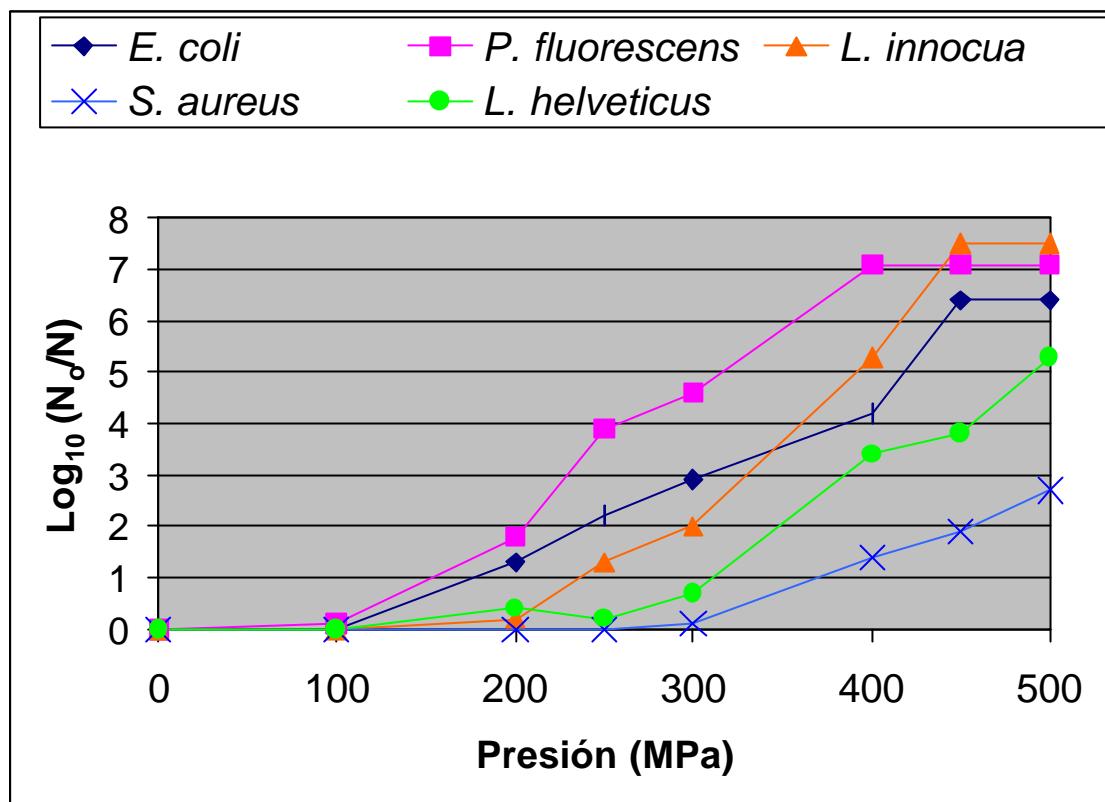


Figura 5: Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 2 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada.

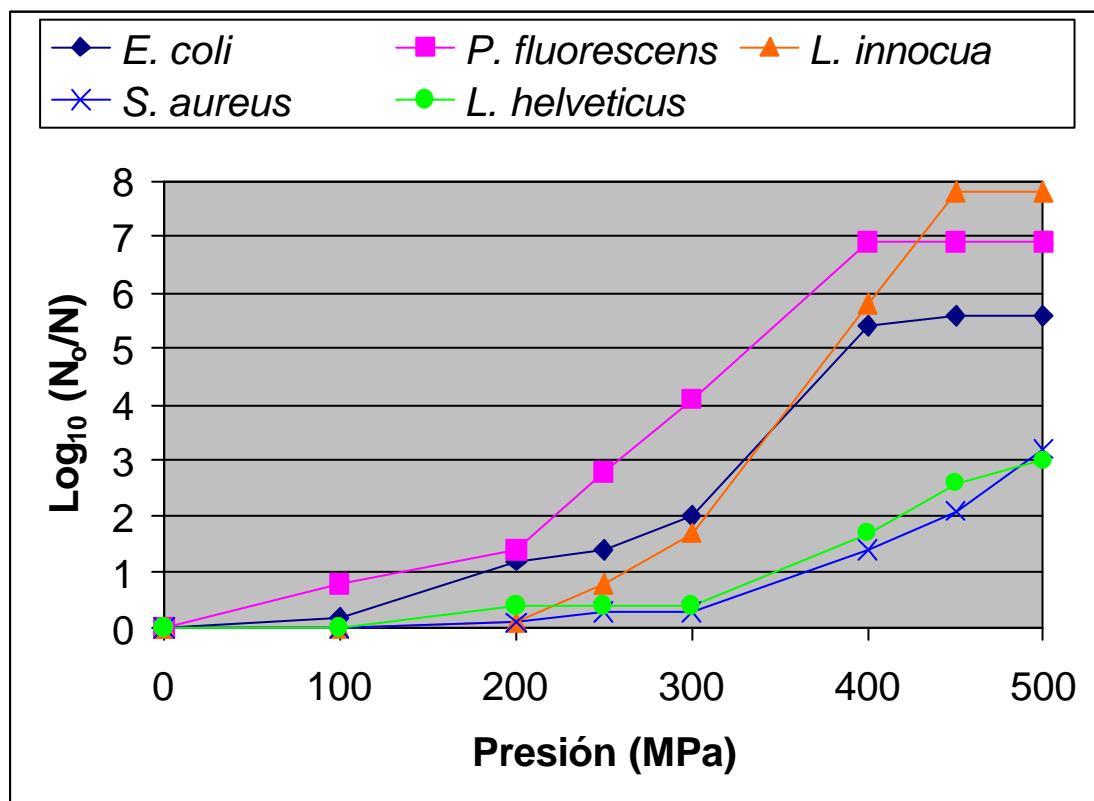


Figura 6: Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 10 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada.

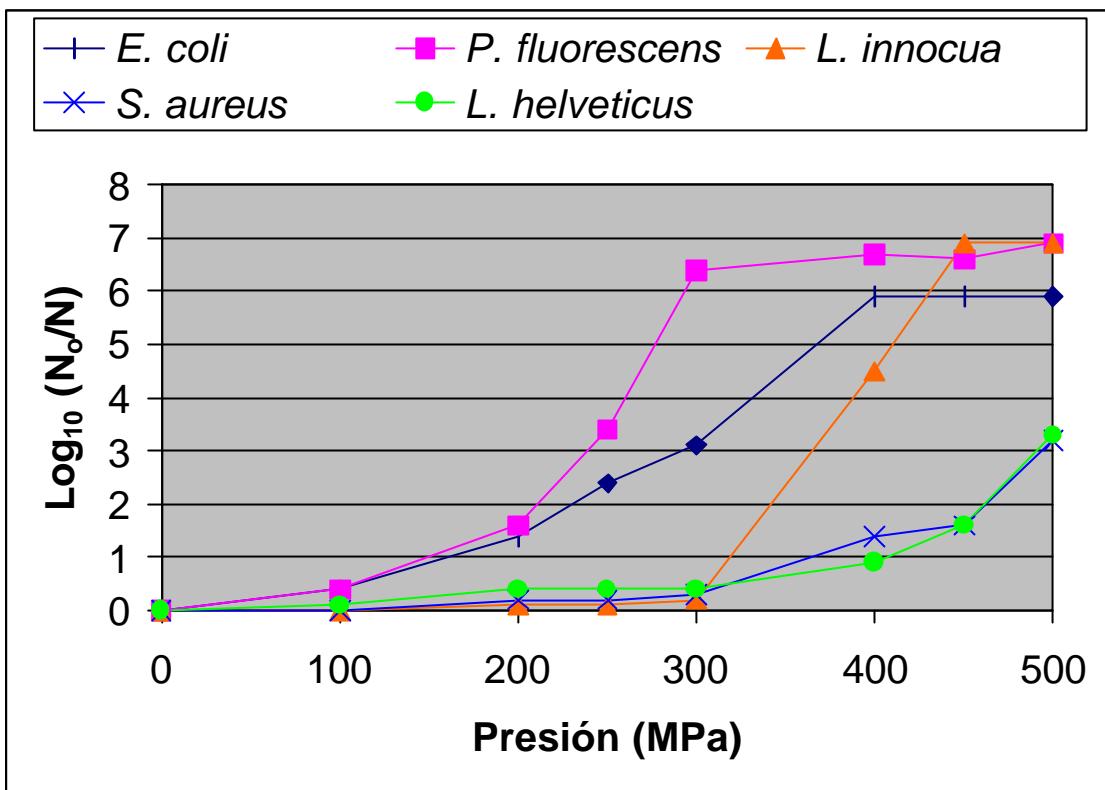


Figura 7: Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 25 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada

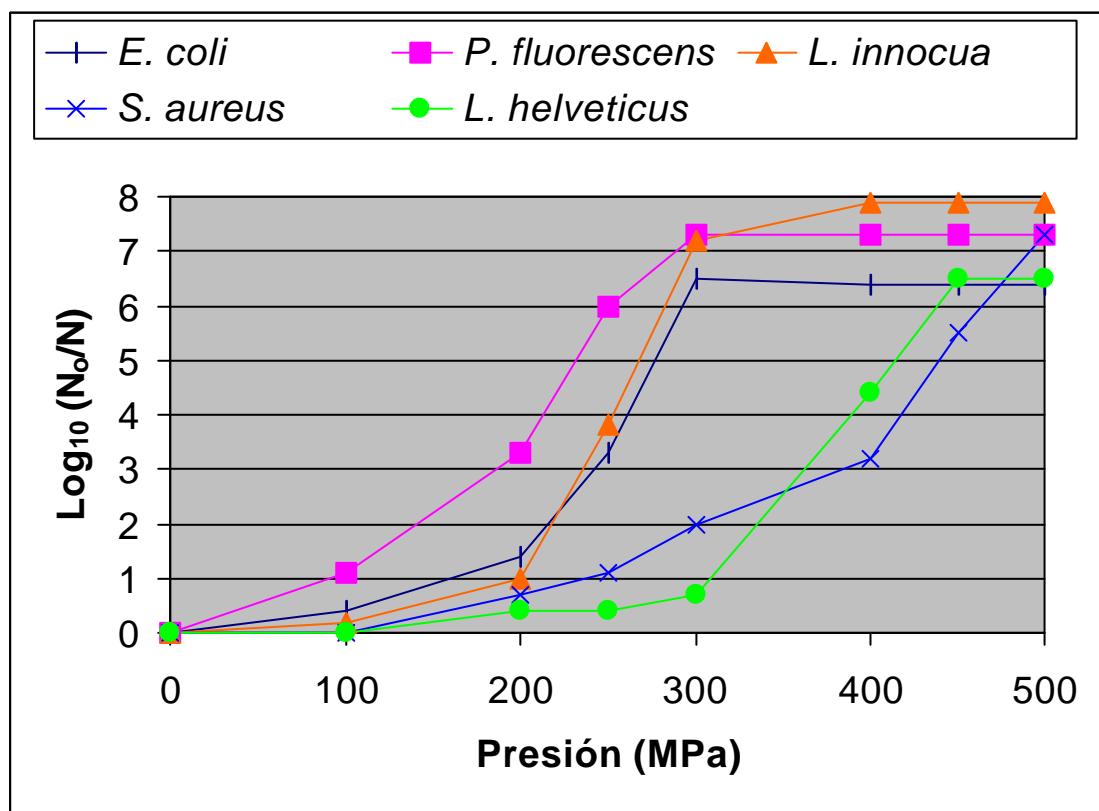


Figura 8: Efecto sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 50 °C durante 15 min. como función de la presión aplicada.

4.2.- ASPECTOS FISICOQUÍMICOS

4.2.1.- TAMAÑO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GLÓBULOS GRASOS

Uno de los objetivos de este trabajo fue obtener información relativa a la estabilidad de la leche respecto a la materia grasa y la distribución de tamaños de los glóbulos grados (**DTGG**) cuando es sometida a tratamientos de alta presión. Tecnológicamente, esta información puede ayudar a entender el comportamiento de la leche durante la etapa de almacenamiento previo a la elaboración de productos lácteos, así como durante el procesado de los mismos. Por otro lado, nutricionalmente, también resulta interesante conocer el tamaño del glóbulo, ya que esta característica, está estrechamente relacionada con la digestibilidad de la fase lipídica de la leche.

El DTGG fue modificado tras someter la leche a los tratamientos de alta presión. El efecto de la variable presión sobre el DTGG causó cambios de forma no gradual. Las máximas diferencias en la DTGG con respecto al control se observaron a presiones de 200 y 300 MPa ($P < 0.05$), mientras que el resto de tratamientos, apenas presentaron diferencias respecto a éste (Tabla 18) (Figura 1, publicación 3.6.). Por otra parte, esta variable tuvo una influencia distinta en los diferentes intervalos de DTGG, provocando mayores cambios con respecto al control en el intervalo de tamaños entre 1-2 μm ($P < 0.05$) (Tabla 18). La temperatura de presurización tuvo una influencia tan importante como la presión (Tabla 19). Los tratamientos realizados a 25 y 50 °C mostraron una tendencia a incrementar el número de glóbulos grados con diámetro de 1-2 μm y disminuir el número de los glóbulos grados con diámetro entre 2 y 10 μm . Por el contrario, los tratamientos a temperatura de refrigeración (4°C) mostraron una tendencia inversa, es decir, causaron una disminución del número de los glóbulos grados con tamaño de 1-2 μm y un aumento del número de los glóbulos grados entre 2 y 10 μm de diámetro (Figura 1, publicación 3.6.).

A simple vista, ninguna de las combinaciones de presión y temperatura utilizadas permitieron observar alteraciones de la estabilidad de la leche, tales como cremado o separación de fases. De hecho, según mostró el estudio del DTGG, el intervalo correspondiente a los glóbulos grados de mayor tamaño, entre 10 y 50 μm , no se vió alterado con respecto al control.

Para valorar de una forma más sencilla el efecto de las altas presiones en las modificaciones que sufre el DTGG la información obtenida se puede expresar como

diámetros medios (Rüegg y Blanc, 1982). De los múltiples parámetros existentes para caracterizar la DTGG, uno de los más utilizados es “ d_{vs} ”, que corresponde a la media aritmética de la distribución volumen-superficie de los glóbulos grados. “ d_{vs} ” fue utilizado para realizar el análisis estadístico y las comparaciones con otros autores, ya que es el parámetro menos dependiente del número de pequeñas partículas. Por la misma razón, como parámetro de dispersión de los resultados, se utilizó “ C_s ”, el cual está basado en el coeficiente de variación de “ d_{vs} ” (Rüegg y Blanc, 1982).

En el intervalo de condiciones de los tratamientos de alta presión, el valor del diámetro medio (d_{vs}) osciló entre 4.3 y 5.1 μm . Por otra parte, al comparar las muestras control con las muestras tratadas por alta presión el diámetro medio apenas varió (Tabla 3, publicación 3.6.), mostrando que el diámetro medio de los glóbulos grados aparentemente no se vio afectado por presiones de hasta 500 MPa. Resultados similares fueron observados por Kanno y col. (1998) en nata líquida (30% de materia grasa) de leche de vaca.

Para evaluar el efecto de los tratamientos de alta presión sobre el cremado de la leche, se utilizó el parámetro “ H ”, el cual permitió comparar entre diferentes muestras la tendencia a la desestabilización que provoca la migración de la fase lipídica hacia la superficie. Las muestras tratadas por alta presión a 4 °C, mostraron mayor tendencia al cremado espontáneo que las tratadas a 25 y 50 °C, siendo éstas últimas más estables con el paso del tiempo.

Paralelamente, a la determinación de la DTGG, la cual fue realizada mediante un contador de partículas, se realizaron diversas observaciones mediante microscopía laser confocal. En dichas observaciones, los glóbulos grados de las muestras tratadas mantuvieron su morfología, y no se apreciaron deformaciones que distaran considerablemente de la forma esférica que mostraban los glóbulos grados de las muestras control (Figura 2, publicación 3.6.). Los ensayos efectuados con presiones de 200 y 300 MPa a 25 y 50 °C, fueron los que dieron lugar a una disminución del tamaño de los glóbulos grados, incrementándose el número y uniformidad de éstos (Figura 2, publicación 3.6., imagen C, 200 MPa / 25 °C) respecto al control (Figura 2, publicación 3.6., imagen A), estando esta observación en concordancia con los resultados obtenidos en la determinación de la DTGG. Los tratamientos de 500 MPa a 25 y 50 °C, apenas mostraron diferencias respecto al control. Sin embargo, a temperatura de refrigeración (4 °C) (Figura 2, publicación 3.6., imagen D, 200 MPa / 4 °C), las imágenes mostraron un incremento del número de glóbulos grados con un diámetro intermedio, ofreciendo el aspecto de una muestra muy homogénea, aunque esta apreciación no coincidió con el cálculo del parámetro “ H ”, el cual indicó que esas leches presentaron una tendencia elevada al cremado.

El incremento del número de glóbulos grasos con pequeño diámetro, que se observó en los tratamientos de 25 y 50 °C entre 200 y 300 MPa, parece que fue debido principalmente a la división de los agregados de glóbulos grasos sin alteración de la estructura de éstos, evitándose el contacto de la materia grasa con la fase acuosa de la leche, que es donde se encuentra el enzima lipoprotein-lipasa. A consecuencia de este comportamiento en las muestras LI, no se detectó un incremento de la concentración de ácidos grasos libres superior al obtenido en la muestras LE, dicho comportamiento está explicado más ampliamente en el siguiente apartado (4.2.2.). Aunque hay estudios que demuestran que a partir de determinadas presiones, el enzima lipoprotein-lipasa ve reducida su actividad (Seyderhelm y col, 1996), en leche tratada a 500 MPa, este enzima, aún conserva cierta actividad residual (Trujillo y col., 1999). Esta actividad podría ser suficiente para provocar un aumento en la concentración de los ácidos grasos libres en aquellas muestras LI donde hubiese habido contacto entre la materia grasa y dicho enzima.

4.2.2.- EVALUACIÓN DE LA LIPOLISIS

La evaluación del efecto de los tratamientos de alta presión sobre la lipolisis se realizó a través de la valoración de la concentración de ácidos grasos libres (**AGL**) considerando la historia de la leche recien ordeñada. La concentración de AGL de esta leche almacenada a 4 °C durante 24 h constituyó el valor de la lipolisis espontánea (**LE**) ocurrida en la muestra. Paralelamente, la leche recien ordeñada fue tratada por altas presiones y seguidamente almacenada también a 4 °C durante 24 h, siendo la concentración en AGL el valor correspondiente a la lipolisis inducida (**LI**) por el tratamiento aplicado.

A la vista de los resultados analizados las diferencias entre LE y LI parece claro que existe un efecto beneficioso de la alta presión sobre la lipolisis, aunque éste es muy dependiente de la temperatura aplicada. Mientras que a 25 °C apenas hay modificaciones, a 4 y 50 °C se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) de la LI. Además, a 50 °C, a partir de 300 MPa se detectaron concentraciones de AGL inferiores que las observadas en la leche recien ordeñada (Tabla 2, publicación 3.6.). Así mismo, a estas temperaturas de presurización, pudo observarse una influencia positiva de la variable presión sobre la LI, que fue más acusada a partir de 300 MPa.

Esta disminución de la LI a 4 y 50 °C podría ser debida a la inactivación total o parcial de la lipoprotein-lipasa nativa (**LPL**) de la leche (Seyderhelm y col., 1996), y a las modificaciones que las altas presiones podrían causar en la composición y estructura de la

membrana de los glóbulos grados, modificaciones debidas a la adsorción de fracciones de las micelas de caseína desintegradas (Law y col., 1998) y de las proteínas séricas desnaturalizadas (Felipe y col., 1997). Estos fenómenos incrementan considerablemente la fuerza o resistencia de la membrana, previniendo excesos de fluidez y posibles fugas de triglicéridos del interior de los glóbulos grados (Dagleish y Banks, 1991). También, estos fenómenos de adsorción de proteínas en la membrana de los glóbulos grados dificultan el anclaje del enzima LPL a la membrana. Por otro lado, los fenómenos de cristalización de la grasa a causa de la presión o las bajas temperaturas, reducen la acción de la LPL sobre ésta, evitando el consiguiente incremento en la lipólisis (Buchheim y Abou El-Nour, 1992). La LI observada en los tratamientos de 300, 400 y 500 MPa a 50 °C, en los que se llegaron a obtener concentraciones de AGL inferiores a las presentadas por la leche recién ordeñada podría indicar que algunas condiciones de tratamientos por alta presión pueden inducir una activación de los enzimas responsables de la reesterificación de los AGL con mono- y diglicéridos en la leche.

4.2.3.- EVALUACIÓN DEL COLOR

El análisis instrumental del color utilizando las coordenadas L^* , a^* y b^* , mostró que a medida que se incrementó la presión, aumentó la diferencia de color respecto a la muestra control ($P < 0.05$) (Table 18). Estas diferencias se vieron reflejadas en una disminución de la luminosidad (L^*) y un aumento de los parámetros ($-a^*$) verde y ($+b$) amarillo (Tabla 1, publicación 3.6.). Respecto a la temperatura, los tratamientos de alta presión a 4 °C, fueron los que mostraron más diferencias totales (ΔE) respecto al control ($P < 0.05$), modificando las tendencias de los parámetros del color (L^* , a^* y b^*) de igual forma que la presión. Diferentes autores han mostrado resultados similares del comportamiento del color en la leche bajo la presión (Adapa y col., 1997; Johnston y col., 1992). Las diferencias entre los valores absolutos de dichas experiencias (leche desnatada de vaca) y las del presente estudio (leche entera de oveja) probablemente son debidas a las diferencias en la composición de la leche, sobre todo de materia grasa. Schmidt y Buchheim (1970) observaron mediante microscopía electrónica la desintegración en pequeños fragmentos de las micelas de caseína a causa de los tratamientos de alta presión, aspecto que ha sido corroborado por numerosos autores. Este aumento del número de pequeñas partículas es el responsable del descenso de la luminosidad (L^*) en la leche (Johnston, 1995).

De todas formas, los cambios de color que visualmente se pudieron observar, solo fueron apreciables cuando la leche fue sometida a tratamientos de 4 °C / 500 MPa, no detectándose visualmente apenas diferencias entre el resto de las muestras tratadas y el control.

5. CONCLUSIONES

- 1.- La supervivencia de los microorganismos estudiados disminuye a medida que se incrementa la presión de los tratamientos desde 100 a 500 MPa. Se observa que son necesarias presiones de 400 MPa para obtener importantes reducciones microbianas, igual o superiores a 4 unidades logarítmicas en la mayoría de las cepas estudiadas.
- 2.- La sensibilidad que presentan los microorganismos tratados con presiones es la siguiente: *Pseudomonas fluorescens* > *Escherichia coli* ≈ *Listeria innocua* > *Lactobacillus helveticus* > *Staphylococcus aureus*, siendo este último el más baroresistente entre todos los microorganismos estudiados.
- 3.- El estudio de la variable temperatura demuestra que existen dos tipos de comportamientos en los microorganismos que ofrecen mayor resistencia a los tratamientos a temperatura ambiente (25 °C) (*P. fluorescens*, *L. innocua* y *L. helveticus*), y los que son a bajas temperaturas (2 y 10 °C) (*E. coli* y *S. aureus*). Sin embargo, para todos los microorganismos, los tratamientos a 50 °C son los más eficaces.
- 4.- Las cinéticas de destrucción microbiana, al menos durante los primeros 15-20 min. de tratamiento, son de 1^{er} orden, siendo en este primer intervalo de tiempo en el que se obtienen las mayores reducciones en la población. Por otro lado, al incrementar el doble la presión, en función del tratamiento y microorganismo, se obtienen valores *D* inferiores a la mitad. Por esto, a nivel práctico no resulta efectivo prolongar los tratamientos más allá de los 15-20 min.
- 5.- La leche de oveja *per se* ejerce un efecto baroprotector sobre los microorganismos en comparación con otros medios como la “solución de Ringer”, independientemente del contenido en materia grasa de ésta.
- 6.- Respecto al contenido de materia grasa, ésta ejerce efectos diferentes sobre la baroprotección microbiana. Así pues, en *E. coli* no posee ningún efecto; en *L. helveticus* y *S. aureus* la materia grasa protege independientemente del contenido de ésta; en *L. innocua*, a medida que se incrementa su contenido ofrece mayor protección; y en *P. fluorescens* la materia grasa protege, pero el incremento de ésta conlleva el efecto contrario.

7.- El color de la leche de oveja apenas cambia por el efecto de las altas presiones. Únicamente en los tratamientos de 500 MPa a 4 °C se aprecian cambios con respecto al control.

8.- En general las altas presiones no inducen lipólisis en la leche de oveja. Incluso, gran parte de las muestras tratadas a 4 y 50 °C presentan valores inferiores de ácidos grasos libres respecto a la leche recién ordeñada, indicando que puede darse una reesterificación de éstos. Únicamente en algunas combinaciones de tratamientos a 25 °C tiene lugar un ligero aumento de la lipólisis.

9.- Los tratamientos a 200 y 300 MPa son los que muestran las mayores diferencias en la distribución del tamaño de los glóbulos grasos. En estas condiciones de presión a 25 y 50 °C se produce un incremento del número de glóbulos grasos del menor tamaño (1-2 μm) en contra de los de entre 2 y 10 μm , mientras que a 4 °C ocurre lo contrario.

10.- En concordancia con el punto anterior y atendiendo al parámetro de cremado, H, las leches tratadas a 4 °C poseen mayor tendencia a la desestabilización que las tratadas a 25 y 50 °C, siendo estas últimas potencialmente más estables en las etapas de reposo.

11.- En los tratamientos aplicados, el diámetro medio “ d_{vs} ” apenas se modifica respecto a la leche tratada. Así mismo, no se observa la formación de glóbulos grasos o agregados de éstos con un diámetro superior a 10 μm .

12.- Considerando los resultados del presente estudio en relación a las reducciones microbianas, color y estabilidad de la fase grasa, la leche de oveja tratada por altas presiones puede considerarse una alternativa a la pasteurización de ésta en la elaboración de quesos de alta calidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F. y K. Horikoshi (1997). The yeast vacuoles may serve as proton sequestrants under high hydrostatic pressure. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 209-212. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Adapa, S., K.A. Schmidt y R. Toledo (1997). Functional properties of skim milk processed with continuous high pressure throttling. *Journal of Dairy Science*, 80: 1941-1948.
- Alichanidis, E. y A. Polychroniadou (1996). Special features of dairy products from ewe and goat milk from physicochemical and organoleptic point of view. En: *Production and utilization of ewe and goat milk*, p. 21-43. International Dairy Federation (IDF), Brussels, Bélgica.
- Angsupanich, K. y D.A. Ledward (1998). Effects of high pressure on lipid oxidation in fish. En: *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, p. 284-288. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Anifantakis, E.M. (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewes' and cows' milk. International Dairy Federation (IDF), 202: 42-53.
- Anuario Lácteo de ILE (1998). FENIL-Industrias Lácteas Españolas.
- Asaka, M. y R. Hayashi (1991). Activation of polyphenoloxidase in pears fruits by high pressure treatment. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 2439-2440.
- Assenat, L. (1991). La leche de oveja. Composición y propiedades. En: *Leche y Productos Lácteos*, Vol. 1, p. 277-311. (Ed.) F.M. Luquet. Acribia S.A., Zaragoza.
- Balny, C. y P. Masson (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9: 611-628.
- Banks, J.E., M.W. Griffiths, J.D. Phillips y D.D. Muir (1988). A comparison of the effects of storage of raw milk at 2 °C and 6 °C on the yield and quality of Cheddar cheese. *Food Microbiology*, 5: 9-16.
- Barsotti, L. y J.C. Cheftel (1999). Traitement des aliments par champs électriques pulsés.2.- Aspects biologiques. *Sciences des Aliments*, 19: 3-33.
- Bogh-Sorensen, L. (1994). Description of hurdles. En: *Food Preservation by Combined Processes*, p. 7-24. (Eds.) L. Leistner y L.G.M. Gorris. European Commision, Final Report FLAIR, Concerted Action N° 7, Subgroup B, Holanda.
- Buchheim, W. y A.M. Abou El-Nour (1992). Induction of milkfat crystallization in the emulsified state by high hydrostatic pressure. *Fat Science Technology*, 94: 369-373.
- Buchheim, W., K. Schrader, C.V. Morr, E. Frede y M. Schütt (1996). Effects of high pressure on the protein, lipid and mineral phase of milk. En: *Heat Treatments and Alternative Methods*, p. 202-213. International Dairy Federation (IDF), Brussels, Bélgica.

- Butz, P. y B. Tauscher (1995). Inactivation of fruit fly eggs by high pressure treatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 19: 161-164.
- Butz, P., G. Habison y H. Ludwing (1992). Influence of High Pressure on a Lipid Coated Virus. En: *High Pressure and Biotechnology*, p. 61-64. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotex Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Buxadé-Carbó, C. (1997). *Ovino de leche: aspectos claves*. Mundi-Prensa, Barcelona.
- Capellas, M. (1998). Aplicación de la alta presión hidrostática en Mató (queso fresco de leche de cabra). *Tesi doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Capellas, M., M. Mor-Mur, E. Sendra, R. Pla y B. Guamis (1996). Populations of aerobic mesophils and inoculated *E. coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressure. *Journal of Food Protection*, 59: 582-587.
- Cheah, P.B. y D.A. Ledward (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43: 123-134.
- Cheftel, J.C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. En: *High Pressure and Biotechnology*, p. 195-209. (Eds) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotex Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Cheftel, J.C. (1995). Hautes pressions, inactivation microbienne et conservation des aliments. *C.R. Agric. Fr.*, 81 (1), 13-38.
- Cheftel, J.C. y J. Culoli (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46: 211-236.
- Cheftel, J.C., J. Lévy y E. Dumay (2000). Pressure-assisted freezing and thawing: principles and potential applications. *Food Review International*, 16: 453-483.
- Chilton, P., N.S. Isaacs, B.M. Mackey y R. Stenning (1997). The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 225-228. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Chong, P.L.G., P.A.G. Fortes y D.M. Jameson (1985). Mechanisms of inhibition of (Na, K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 14484-14490.
- Código Alimentario Español y disposiciones complementarias (CAE) (1997). *Leches y derivados*, p. 120-121. Tecnos S.A., Madrid.
- Cottier, H. (1991). Producción de leche de oveja. En: *Leche y Productos Lácteos*, Vol. 1, p. (Ed.) F.M. Luquet. Acribia S.A., Zaragoza.
- Cousin, M.A. (1982). Pressure and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, 45: 172-207.

- Da Poian, A., A.C. Oliveira, L. Gaspar, J.L. Silva y G. Weber (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *Journal of Molecular Biology*, 231: 999-1008.
- Dalgleish, D.G. y J.M. Banks (1991) The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft*, 46: 75-78.
- De Jong P., R. Waalewijn y H.J.L.J. van der Linden (1994). Performance of a steam-infusion plant for heating of milk. *Netherland Milk Dairy Journal*, 48: 181-199.
- Deuchi, T. y R. Hayashi (1991). Pressure application to thawing of frozen foods and to food preservation under subzero temperature. En: *High Pressure Science for Food*, p. 101-110. (Ed.) R. Hayashi. San-Ei Publishing Company, Kyoto, Japón.
- Driessen, F.M. (1993). Lipases and proteases in milk. Occurrence, heat inactivation, and their importance for the keeping quality of milk products. *Netherland Milk Dairy Journal*, 37: 193-196.
- Dumay, E., C. Lambert, S. Funtenberg y J.C. Cheftel (1996). Effects of high pressure on physical-chemical characteristics of dairy creams and model O/W emulsions. *Lebensmittel-Wiss-Technologie*, 29: 606-610.
- Dunn J. (1996). Pulsed light and Pulsed electric field for foods and eggs. *Poultry Science*, 75: 1133-1136.
- Dunn J., T. Ott y W. Clark (1995). Pulsed-light treatment of food and packaging. *Food Technology*, 9: 95-98.
- Earnshaw, R.G. (1995). Kinetics of high pressure inactivation of microorganisms. En: *High Pressure Processing of Foods*, p. 37-46. (Eds.) L.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw y A.P.M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.
- Earnshaw, R.G., J. Appleyard y R.M. Hurst (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal Food Microbiology*, 28: 197-219.
- FAO (1999). Datos agrícolas de FAOSTAT. A FAOSTAT statistics database (<http://www.fao.org>). © Copyright FAO 1990-1999.
- Felipe, X. y A.J.R. Law (1997). Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. *Journal of Dairy Research*, 64: 459-464.
- Felipe, X., M. Capellas y A.J.R. Law (1997). Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 627-631.
- Ferragut, V. y E.C. Needs (1997). The rheology of set yogurt gels formed from high pressure treated milk. Book of Abstracts of the 35th Meeting on High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry of the EHPRG, Reading, Reino Unido.

Fryer P. (1995). Electrical resistance heating of foods. En: New Methods of Food Preservation, p. 205-235. (Ed.) G.W. Gould. Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), Bishopbriggs, Reino Unido.

Fujii, S., H. Iwahashi, K. Obuchi, T. Fujii y Y. Komatsu (1997). Characterization of a barotolerant mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Importance of trehalose content and membrane fluidity. En: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, p. 241-244. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.

Galazka, V., D.A. Ledward, I.G. Sumner y E. Dickinson (1997). Influence of high pressure on bovine serum albumin and its complex with dextran sulfate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3465-3471.

Gaucheron F., M.H. Famelart, F. Mariette, K. Raulot, F. Michel y Y. Le-Graet (1997). Combined effects of temperature and high pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. Food Chemistry, 59: 439-447.

Gill, A.L., V. Ferragut, A.J. Owen y E.C. Needs (1997a). The effect of high pressure on milk proteins and the structure of rennet gels. Book of Abstracts of the 35th Meeting on High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry of the EHPRG, Reading, Reino Unido.

Gill, A.L., V. Ferragut, A.J. Owen, G. Rich y E.C. Needs (1997b). Changes in casein micelle size and composition at high pressure: the effect on kinetics of enzymatic coagulation. Book of Abstracts of the 35th Meeting on High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry of the EHPRG, Reading, Reino Unido.

Glaeser, H. (1996). Alternative methods: legal and control aspects. En: Heat Treatments and Alternative Methods, p. 438-447. International Dairy Federation (IDF), Brussels, Bélgica.

Gould, G.W. (1995). The microbe as a high pressure target. En: High Pressure Processing of Foods, p. 27-36. (Eds.) D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw y A.P.M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.

Griffiths, M.W. y J.D. Phillips (1990). Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* sp. found in raw and pasteurized milk. Journal Society Dairy Technology, 43: 62-66.

Griffiths, M.W., J.D. Phillips y D.D. Muir (1987). Effect of low-temperature storage on the bacteriological quality of raw milk. Food Microbiology, 4: 285-291.

Gross, M. y R. Jaenicke (1994). Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. European Journal of Biochemistry, 221: 617-630.

Guamis, B., T. Huerta y E. Garay (1987a). SDS-PAGE study of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw milk. Milchwissenschaft, 42: 89-91.

Guamis, B., T. Huerta y E. Garay (1987b). Heat-inactivation of bacterial proteases in milk before UHT-treatment. Milchwissenschaft, 42: 651-653.

- Gustin, D., F. Bera, Q. Dumont-de-Chassart y B. Mertens (1997). Pectin Gelification under HHP: gel Properties and formation Mechanisms. En: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, p. 195-198. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press. Leuven, Bélgica.
- Haenlein, G.F.W. (1996). Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. En: Production and utilization of ewe and goat milk, p. 159-167. International Dairy Federation (IDF), Brussels, Bélgica.
- Hauben, K.J.A., D.H. Bartlett, C.C.F. Soontjens, K. Cornelis, E.Y. Wuytack y C.W. Michiels (1997). *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. Applied and Environmental Microbiology, 3: 945-950.
- Hayashi, R. y A. Hayashida (1989). Increased amylase digestibility of pressure-treated starch. Agricultural and Biological Chemistry, 53: 2543-2544.
- Heinz, V. y D. Knorr (1998). High pressure germination and inactivation kinetics of bacterial spores. En: High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry, p. 435-441. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Heremans, K. (1992). From living systems to biomolecules. En: High Pressure and Biotechnology, p. 37-44. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson). John Libbey Eurotext Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Heremans, K. (1995). High pressure effects on biomolecules. En: High Pressure Processing of Foods, p. 81-97. (Eds.) D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw y A.P.M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.
- Hölters, C., B. Sojka y H. Ludwig (1997). Pressure-induced germination of bacterial spores from *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. En: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, p. 257-260. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Hoover, D.G., C. Metrick, A.M. Papineau, D.F. Farkas y D. Knoor (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. Food Technology, 43: 99-107.
- Iametti S., P. Transidico, F. Bonomi, G. Vecchio, P. Pittia, P. Rovere y G. Dall'Aglio (1997). Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 23-29.
- International Dairy Federation (IDF) (1994). Cheese yield and factors affecting its control. Proceedings of the IDF seminar held in Cork, April 1993. International Dairy Federation, Brussels, Bélgica.
- Isaacs, N.S., P. Chilton y B. Mackey (1995). Studies on the inactivation by high pressure of micro-organisms. En: High Pressure Processing of Foods, p. 65-79. (Eds.) D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw y A.P.M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.
- Jandal, J.L. (1996). Effect of thermal, physical and chemical treatments on FFA contents in Awassi sheep milk. Small Rumunant Research, 22: 49-53.

- Jensen J.A. (1996). Recent developments in direct and indirect UHT systems. En: *Heat Treatments and Alternative Methods*, p. 44-50. International Dairy Federation (IDF), Brussels, Bélgica.
- Jin, Z.T. y W.J. Harper (1996). Effects of high pressure treatments on changes of microflora and aroma profile in accelerated ripening of cheese slurry. *Journal of Dairy Science*, 79, Suplemento 1: 114.
- Johnston, D.E. (1995). High pressure effects on milk and meat. En: *High Pressure Processing of Foods*, p. 99-121. (Eds.) D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw y A.P.M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.
- Johnston, D.E., B.A. Austin y R.J. Murphy (1992). The effects of high pressure treatment of skim milk. En: *High Pressure and Biotechnology*, p. 243-247. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotext Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Johnston, D.E., S.M. McKinney y R.W. McCready (1997). The effects of high pressure on some functional properties of whey proteins. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 403-406. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Johnston, D.E., R.J. Murphy, J.A. Rutherford y C.A. McElhone (1998). Formation and syneresis of rennet-set gels prepared from high pressure treated milk. En: *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, p. 220-226. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Kalichevsky, M.T., D. Knorr y P.J. Lillford (1995). Potential food applications of high pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 253-259.
- Kanno, C. y T. Uchimura (1997). The effect of high pressure on physico-chemical properties of bovine milk fat globules and milk fat globule membrane. Book of Abstracts of the 35th Meeting on High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry of the EHPRG, Reading, Reino Unido.
- Kanno, C., T. Uchimura, T. Hagiwara, M. Ametani y N. Azuma (1998). Effect of hydrostatic pressure on the physicochemical properties of bovine milk fat globules and the milk fat globule membrane. En: *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, p. 182-192. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Knorr, D. (1995). Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology. En: *New Methods of Food Preservation*, p. 159-175. (Ed.) G.W. Gould. Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), Bishopbriggs, Reino Unido.
- Kübel, J., H. Ludwig y B. Tauscher (1997). Influence of UHP on vitamin A acetate content. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 331-334. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Kunugi, S. y N. Tanaka (1997). Effect of pressure on protease reactions -activation, disactivation and specificity-. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 79-82. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.

- Larkin, J.W. y S.H. Spinak (1996). Safety considerations for ohmically heated, aseptically processed, multiphase low-acid food products. *Food Technology*, 50 (5): 242-245.
- Law, A.J.R. (1995). Heat denaturation of bovine, caprine and ovine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 50: 384-388.
- Law, A.J.R., J. Leaver, X. Felipe, V. Ferragut, R. Pla y B. Guamis (1998). Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2523-2530.
- Lee, S.K., S.G. Anema, K. Schrader y W. Buchheim (1996). Effect of high hydrostatic pressure on Ca-caseinate systems. *Milchwissenschaft*, 51: 17-21.
- López-Fandiño, R., A.V. Carrascosa y A. Olano (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 79: 929-936.
- Ludwig, H. y Ch. Schreck (1997). The inactivation of vegetative bacteria by pressure. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 221-224. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Luquet, F.M. (1991). Leche y productos lácteos, vaca, oveja y cabra. Vol. 1. Acribia S.A., Zaragoza.
- MacDonald, A.G. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on natural and artificial membranes. En: *High Pressure and Biotechnology*, p. 67-75. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotext Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Mackey, B.M., K. Forestière y N.S. Isaacs (1995). Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 9: 1-11.
- Makita, T., H. Hane, N. Kanyama y K. Shimizu (1991). Behavior of water under high pressure in relation to food processing. En: *High Pressure Science for Food*, p. 93-100. (Ed.) R. Hayashi. San-Ei Publishing Company, Kyoto, Japón.
- Mertens, B. (1993). Packing aspects of high-pressure food processing technology. *Packaging Technology and Science*, 6: 31-36.
- Mertens, B. (1995). Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. En: *New Methods of Food Preservation*, p. 135-158. (Ed.) G.W. Gould. Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), Bishopbriggs, Reino Unido.
- Messens, W. y A. Huyghebaert (1996). Brining og cheese curd under high pressure. Book of Abstracts of FLAIR-Flow Europe Symposium: High Pressure Processing of Foods. Colonia, Alemania.
- Messens, W. y A. Huyghebaert (1997). Progress Report, EC-AIR Prog. N° 1113, Brussels, Bélgica.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (1999). Datos agrícolas, censos y producción (<http://www.mapya.es>).

- Miyama, K., S. Sakakiba y T. Okamoto (1992). High pressure treatment of polished rice for Sake brewing: properties of pressurized rice as a raw material. En: High Pressure and Biotechnology, p. 357-360. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotex Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Mozhaev, V.V., K. Heremans, J. Frank, P. Masson y C. Balny (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. Trends in Biotechnology, 12: 493-501.
- Muñoz, M. y G. Yoldi (2000). Leche y derivados. En: Alimentos: Composición y Propiedades, p. 69-108. (Eds.) I. Astiasarán y J.A. Martínez. McGraw-Hill Interamericana de España S.A.U., Madrid.
- Murphy, S.C., K. Cranker, G.F. Senyk y D.M. Barbano (1989). Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. Journal of Dairy Science, 72: 620-626.
- Mussa, D.M. y H.S. Ramaswamy (1996). Ultra high pressure pasteurization of milk: kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. Lebensmittel-Wiss-Technologie, 30: 551-557.
- Núñez, J.A., F.J. Chavarri y M. Núñez (1984). Psychrotrophic bacterial flora of rwa ewes' milk, with particular reference to Gram negative rods. Journal Applied Bacteriology, 57: 23-29.
- Ogawa, H., K. Fukuhisa, Y. Kubo y H. Fukumoto (1990). Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation. Agricultural and Biological Chemistry, 54: 1219-1225.
- Ohmiya, K., T. Kajino, S. Shimizu y K. Gekko (1989). Effect of pressure on the association states of enzyme-treated caseins. Agricultural and Biological Chemistry, 53: 1-7.
- Ohmori, T., T. Shigehisa, S. Taji y R. Hayashi (1991). Effect of high pressure on the protease activities in meat. Agricultural and Biological Chemistry, 55: 357-361.
- Ohmori, T., T. Shigehisa, S. Taji y R. Hayashi (1992). Biochemical effects of high hydrostatic pressure on the lysosome and proteases involved in it. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 56: 1285-1288.
- Ohnishi, Y., T. Ono, T. Shigehisa y T. Ohmori (1993). Effect of high hydrostatic pressure to muscle larvae of *Trichinella spiralis*. En: High Pressure Bioscience and Food Science, p. 139-146. (Ed.) R. Hayashi. San-Ei Publishing Company, Kyoto, Japón.
- Okamoto, M., R. Hayashi, A. Enomoto, S. Kaminogawa y K. Yamauchi (1991). High pressure proteolitic digestion of food proteins: selective elimination of β -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate. Agricultural and Biological Chemistry, 55: 1253-1257.
- Olson, D.G. (1998). Irradiation of food. Food Technology, 52 (1): 56-62.
- Oxen, P. y D. Knorr (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. Lebensmittel-Wiss-Technologie, 26: 220-223.

- Patterson, M.F. y D.J. Kilpatrick (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61: 432-436.
- Patterson, M.F., M. Quinn, R. Simpson y A. Gimour (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58: 524-529.
- Payens, T.A.J. y K. Heremans (1969). Effect of pressure on the temperature-dependent association of β -casein. *Biopolymers*, 8: 335-345.
- Pittia, P., P.J. Wilde, F.A. Husband y D.C. Clark (1996). Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment. *Journal of Food Science*, 61(6): 1123-1128.
- Ponce, E., R. Pla, M. Mor-Mur, R. Gervilla y B. Guamis (1998). Inactivation of *Listeria innocua* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 61: 119-122.
- Pontes, L., L.A. Fornells, V. Giongo, J.R.V. Araujo, A. Sepulveda, M. Villas-Boas, C.F.S. Bonafe y J.L. Silva (1997). Pressure inactivation of animal viruses: potential biotechnological applications. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 91-94. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Popper, L. y D. Knorr (1990). Applications of high hydrostatic pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, 44: 84-89.
- Puhan, Z. (1989). Influence of cold storage on milk-chemical aspects. *Sci. Tec. Latt. Cass.*, 40 (5): 340-363.
- Rademacher, B. y H.G. Kessler (1997). Inactivation of microorganisms and enzymes in pressure-treated raw milk. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 291-294. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Raffalli, J., J.P. Rosec, A. Carlez, E. Dumay, N. Richard y J.C. Cheftel (1994). Stress et inactivation par haute pression de *Listeria innocua* introduites dans une crème laitière. *Sciences des Aliments*, 14: 349-358.
- Real Decreto (1994). Establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. RCL 1994/2664, número 1679/1994 de 22-7-1994.
- Reps, A., P. Kolakowski y F. Dajnowiec (1997). The effect of high pressure on microorganisms and enzymes of ripening cheeses. En: *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, p. 265-270. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Rouco, P.F. y F.J. Calahorra (1993). Producción de leche. *Ovis*, 24: 31-40.
- Rubens, P., K. Goossens y K. Heremans (1997). Pressure induced gelatinisation of different starch types: a FTIR study. En: *High Pressure Research in the Biosciences and*

Biotechnology, p. 191-194. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.

Rüegg, M. y B. Blanc (1982). Structure and properties of the particle constituents of human milk. *Food Microstructure*, 1: 25-47.

Russell, N.J., R.I. Evans, P.F. ter Steeg, J. Hellemons, A. Verheul y T. Abee (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 255-261.

Sala, F.J., J. Burgos, S. Condón, P. López y J. Raso (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. En: *New Methods of Food Preservation*, p. 176-204. (Ed.) G.W. Gould. Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), Bishopbriggs, Reino Unido.

Schmidt, D.G. y W. Buchheim (1970). Elektronenmikroskopische untersuchung der feinstruktur von caseinmicellen in kuhmich. *Milchwissenschaft*, 25: 596-600.

Schrader, K. y W. Buchheim (1995). High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. *Abstracts of the International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Kyoto, Japón.

Schrader, K. y W. Buchheim (1997). High pressure effects on mineral equilibria and protein interactions in milk. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 411-414. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Lueven, Bélgica.

Sendra, E., M. Capellas, B. Guamis, X. Felipe, M. Mor-Mur y R. Pla (1996). Revisión: irradiación de alimentos.- Aspectos generales. *Food Science and Technology International*, 2: 1-11.

Seyderhelm, I., S. Boguslawski, G. Michaelis y D. Knorr (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61 (2): 308-310.

Shelley, A.W., H.C. Deeth y I.C. McRae (1987). A numerical taxonomy study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. *Journal Applied Bacteriology*, 62: 197-207.

Shigehisa, T., T. Ohmori, A. Saito, S. Taji y R. Hayashi (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal Food Microbiology*, 12: 207-216.

Shimada, S., M. Andou, N. Naito, N. Yamada, M. Osumi y R. Hayashi (1993). Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 123-131.

Silva, J.L. y G. Weber (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 199: 149-159.

Silva, J.L., P. Luan, M. Glaser, E.W. Voss y G. Weber (1992). Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *Journal of Virology*, 66: 2111-2117.

- Simpson, R.K. y A. Gilmour (1997). The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. *Food Microbiology*, 14: 567-573.
- Sionneau, M., J. Vasseur, M. Bouix y P.M. Pontvianne (1997). Continuous high pressure treatment of milk. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 451-453. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Sitzmann, W. (1995). High-voltage pulse techniques for food preservation. En: *New Methods of Food Preservation*, p. 236-252. (Ed.) G.W. Gould. Blackie Academic and Professional (Chapman and Hall), Bishopbriggs, Reino Unido.
- Smeller, L., K. Goosens y K. Heremans (1995). Determination of the secondary structure of proteins at high pressure. *Vibrational Spectroscopy*, 8: 199-203.
- Smelt, J.P.P.M. (1993). High pressure inactivation of microorganisms: possible mechanisms of inactivation. *Progress Report, EC-AIR Prog.* Nº 296, Brussels, Bélgica .
- Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trend in Food Science and Technology*, 9: 152-158.
- Sojka, B. y H. Ludwig (1994). Pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Die Pharmazeutische Industrie*, 56: 660-663.
- Styles, M.F., D.G. Hoover y D.F. Farkas (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56: 1404-1407.
- Szczawinski, J., B. Stanczack, M. Szczawinska, M. Fonberg-Broczek, J. Arabas y J. Szczepek (1996). Effect of high pressure on survival of *Listeria monocytogenes* in ripened, sliced cheeses at ambient temperature. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 295-298. (Ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Takahashi, K. (1992). Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperatures. En: *High Pressure and Biotechnology*, p. 303-307. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotex Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Tanaka, T. y K. Hatanaka (1992). Application of hydrostatic pressure to yogurt to prevent its after-acidification. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39: 173-177.
- Tanaka, T. y K. Hatanaka (1993). Effect of high pressure treatment to prevent the after-acidification of yogurt. En: *High Pressure Science for Food*, p. (Ed.) R. Hayashi. San-Ei Publishing Company, Kyoto, Japón.
- Taoukis, P.S., P. Panagiotidis, N.G. Stoforos, P. Butz, H. Fister y B. Tauscher (1998). Kinetics of vitamin C degradation under high pressure-moderate temperature processing in model systems and fruit juices. En: *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, p. 310-316. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.

- Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 200: 3-13.
- Tonello, C., A. Largeteau, F. Jolibert, A. Deschamps y G. Demazeau (1992). Pressure effect on microorganisms and immunoglobulins in bovine colostrum. En: *High Pressure and Biotechnology*, p. 249-253. (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. John Libbey Eurotex Ltd., colloque INSERM Vol. 224, Montrouge, Francia.
- Torres-Mora, M.A., A. Soeldner, E.Y. Ting, A.C.O. Hawes, G.D. Alemán, G.S. Bakshi, W.R. McManus, C.L. Hansen y J.A. Torres (1996). Early microstructure changes in cheddar cheese and the effect of ultra high pressure curd processing. Book of Abstracts of 1996 IFT Annual Meeting, p. 9, New Orleans, USA.
- Trujillo, A.J. (1996). Procesos de proteolisis primaria que intervienen en la maduración del queso de cabra. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Trujillo, A.J., V. Ferragut, R. Gervilla, M. Capellas y B. Guamis (1997). High hydrostatic pressure effects on milk and milk products. *Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry*, 1: 137-159.
- Trujillo, A.J., C. Royo, B. Guamis y V. Ferragut (1999). Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft*, 54: 197-199.
- Tsiklis, D.S. (1968). *Handbook of Techniques in High-Pressure Research and Engineering*. Plenum Press, New York, USA.
- Van Camp, J., W. Messens, J. Clément y A. Huyghebaert (1997). Influence of pH and sodium chloride on the high pressure-induced gel formation of a whey protein concentrate. *Food Chemistry*, 60: 417-424.
- Villamiel, M., R. López-Fandiño y A. Olano (1997). Microwave pasteurization of milk in a continuous flow unit. Effects on the cheese-making properties of goat's milk. *Milchwissenschaft*, 52: 29-32.
- Walker, S.J. (1988). Major spoliage micro-organisms in milk and dairy products. *Journal Society Dairy Technology*, 41: 91-92.
- Wuytack, E., J. Soons y C. Michiels (1997). Rapid measurement of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores expresing green fluorescent protein. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p. 261-264. (Ed) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Yokohama, H., N. Sawamura y N. Motobayashi (1993). Method for ripening cheese under high pressure. United States Patent Nº 5180596.

7. ANEXO I

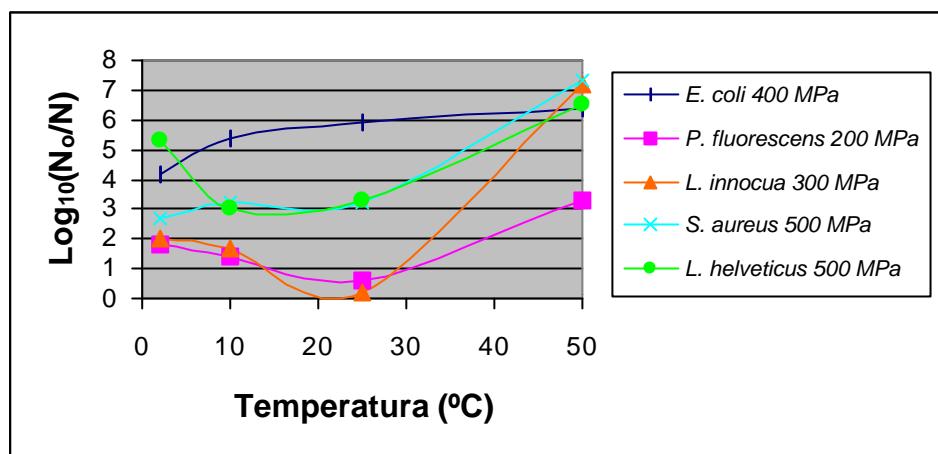


Figura 9: Tendencias sobre la letalidad en los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a diferentes presiones durante 15 min. como función de la temperatura del tratamiento

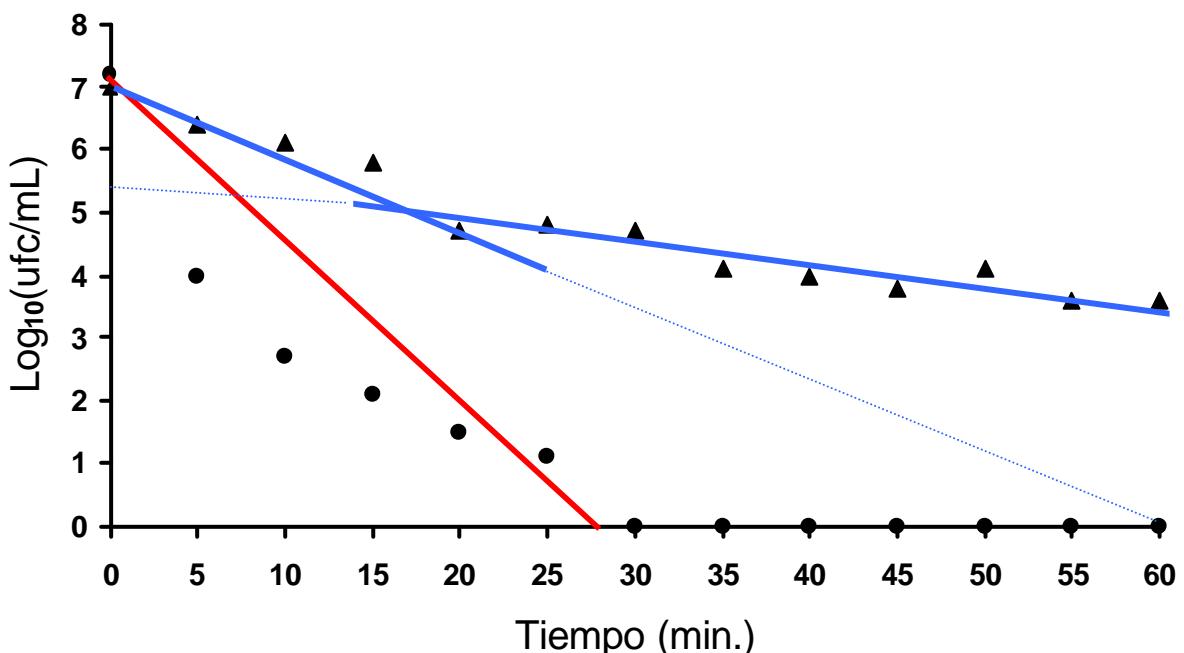


Figura 10: Ejemplo de supervivencia para *L. innocua* (400 MPa / 25 °C) (●) y *L. helveticus* (450 MPa / 25 °C) (▲) en períodos prolongados de tratamiento por altas presiones. Cinéticas de destrucción microbiana.

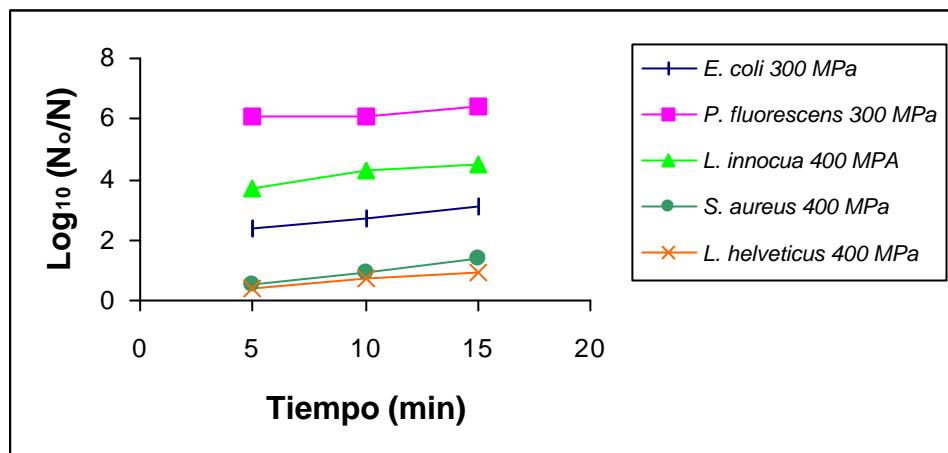


Figura 11: Efecto sobre la letalidad de los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 25 °C y diferentes presiones como función del tiempo aplicado del tratamiento

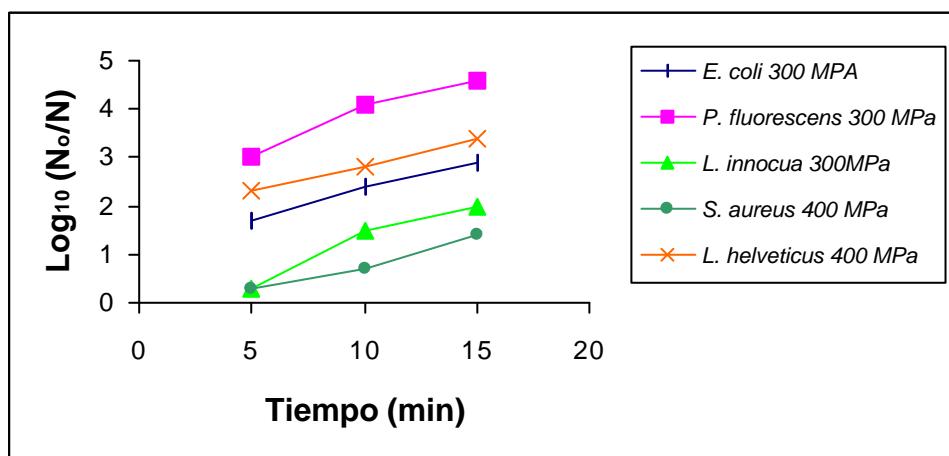


Figura 12: Efecto sobre la letalidad de los microorganismos estudiados (en leche de oveja 6% materia grasa) a 2 °C y diferentes presiones como función del tiempo aplicado del tratamiento.

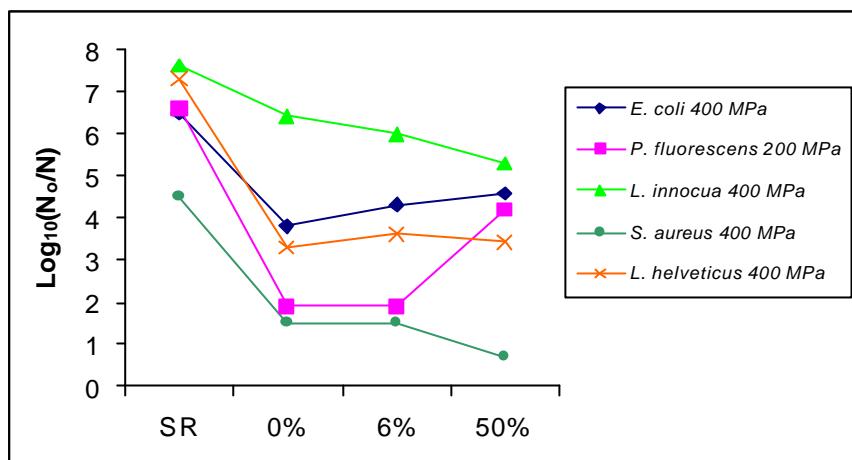


Figura 13: Efecto sobre la letalidad de los microorganismos estudiados a 4 °C con diferentes presiones durante 15 min. como función de la composición del medio donde se aplicó el tratamiento.

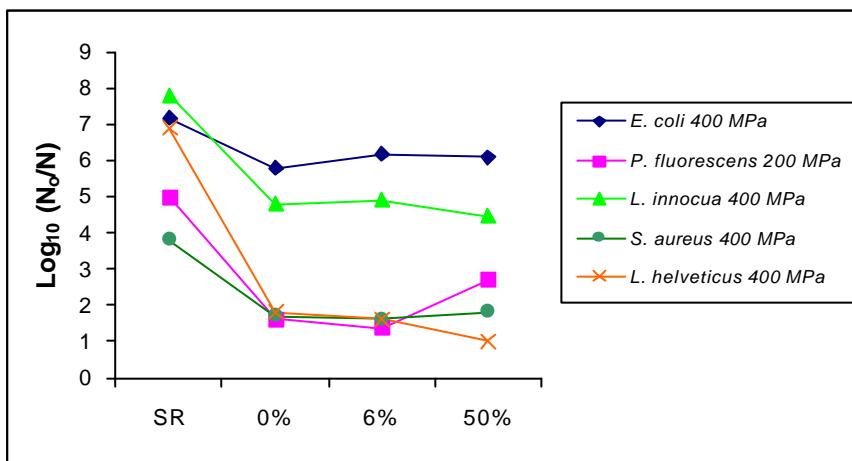


Figura 14: Efecto sobre la letalidad de los microorganismos estudiados a 25 °C con diferentes presiones durante 15 min. como función de la composición del medio donde se aplicó el tratamiento.

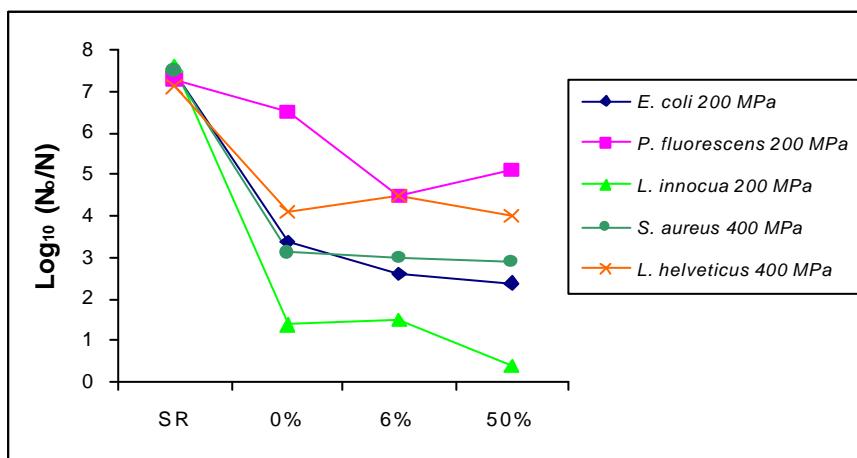


Figura 15: Efecto sobre la letalidad de los microorganismos estudiados a 50 °C con diferentes presiones durante 15 min. como función de la composición del medio donde se aplicó el tratamiento.

Tabla 11: Niveles de significación para la variable “presión” en los microorganismos estudiados.

Microorganismo	Valores ($P < 0.05$)
<i>E. coli</i>	^a $50 < 100 < 150 = 200 < 250 < 300 < 400 < 450 = 500$ MPa
<i>P. fluorescens</i>	$50 < 100 = 150 < 200 < 250 < 300 < 400 = 450 = 500$ MPa
<i>L. innocua</i>	$200 < 300 < 350 < 400 = 450 = 500$ MPa
<i>S. aureus</i>	$200 < 300 < 400 < 450 < 500$ MPa
<i>L. helveticus</i>	$200 < 300 < 400 < 450 < 500$ MPa

^a ($X < Y$) si diferencias significativas ($P < 0.05$), mayor letalidad en Y ; ($X = Y$) no diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla 12: Niveles de significación para la variable “temperatura” en los microorganismos estudiados.

Microorganismo	Valores ($P < 0.05$)
<i>E. coli</i>	^{a,b} Refrigeración < Ambiente < Moderadamente Altas
<i>P. fluorescens</i>	Ambiente < Refrigeración < Moderadamente Altas
<i>L. innocua</i>	Ambiente < Refrigeración < Moderadamente Altas
<i>S. aureus</i>	Refrigeración < Ambiente < Moderadamente Altas
<i>L. helveticus</i>	Ambiente < Refrigeración < Moderadamente Altas

^a ($X < Y$) si diferencias significativas ($P < 0.05$), mayor letalidad en Y ; ($X = Y$) no diferencias significativas ($P > 0.05$).

^b Refrigeración (2, 4 y 10°C), Ambiente (25°C), Moderadamente Altas (50°C).

Tabla 13: Niveles de significación para la variable “tiempo” en los microorganismos estudiados

Microorganismo	Valores ($P < 0.05$)
<i>E. coli</i>	^a $5 < 10 < 15$ min
<i>P. fluorescens</i>	$5 < 10 < 15$ min
<i>L. innocua</i>	$5 < 10 < 15$ min
<i>S. aureus</i>	$5 < 10 < 15$ min
<i>L. helveticus</i>	$5 < 10 < 15$ min

^a ($X < Y$) si diferencias significativas ($P < 0.05$), mayor letalidad en Y ; ($X = Y$) no diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla 14: Niveles de significación para la variable “composición del medio” en los microorganismos estudiados.

Microorganismo	Valores ($P < 0.05$)
<i>E. coli</i>	^{a,b} 50 = 0 = 6 << SR
<i>P. fluorescens</i>	6 < 50 < 0 << SR
<i>L. innocua</i>	50 < 6 < 0 << SR
<i>S. aureus</i>	50 = 6 < 0 << SR
<i>L. helveticus</i>	50 = 6 < 0 << SR

^a ($X < Y$) si diferencias significativas ($P < 0.05$), mayor letalidad en Y ; ($X = Y$) no diferencias significativas ($P > 0.05$).

^b 0 (leche de oveja al 0% materia grasa), 6 (leche de oveja al 6% materia grasa), 50 (leche de oveja al 50% materia grasa) y SR (Solución de Ringer).

Tabla 15: Valores F en los microorganismos estudiados.

Microorganismo	Valores F ($P < 0.05$)
<i>E. coli</i>	Presión + Medio
<i>P. fluorescens</i>	Presión + Temperatura
<i>L. innocua</i>	Presión + Medio
<i>S. aureus</i>	Presión + Temperatura + Medio
<i>L. helveticus</i>	Medio + Presión

Tabla 16: Composición media de la leche de oveja utilizada en este estudio.

Parámetros	^a Media (%)	Desviación Estándar (\pm %)
Extracto seco	18.47	1.72
Materia grasa	7.63	1.48
Proteína total	5.74	0.18
Cenizas	1.17	0.12
p H	6.67	0.08

^a Media y desviación estándar obtenidas de las seis publicaciones objeto de esta tesis.

Tabla 17: Tiempos de reducción decimal (Valores *D*) a diferentes presiones y temperaturas en los microorganismos estudiados.

Microorganismo	Tratamientos	Valores <i>D</i> (minutos)
<i>E. coli</i>	250 MPa / 2°C	6.83
	300 MPa / 2°C	5.35
	250 MPa / 10°C	11.14
	300 MPa / 10°C	8.13
	200 MPa / 25°C	9.51
	250 MPa / 25°C	6.4
	300 MPa / 25°C	5.19
	150 MPa / 50°C	18.8
	250 MPa / 50°C	4.86
	300 MPa / 50°C	2.53
<i>P. fluorescens</i>	250 MPa / 2°C	3.87
	300 MPa / 2°C	3.38
	250 MPa / 10°C	5.27
	300 MPa / 10°C	3.56
	200 MPa / 25°C	23.26
	250 MPa / 25°C	4.58
	150 MPa / 50°C	6.35
	250 MPa / 50°C	2.75
<i>L. innocua</i>	400 MPa / 2°C	3.12
	400 MPa / 25°C	4
<i>S. aureus</i>	450 MPa / 2°C	20
	450 MPa / 25°C	16.7
<i>L. helveticus</i>	450 MPa / 2°C	7.1
	450 MPa / 25°C	9.1

Tabla 18: Niveles de significación de las variables analizadas en los parámetros fisicoquímicos estudiados.

Variables	Valores ($P < 0.05$)	Parámetros
Presión	^a $100 < 200 < 300 < 400 < 500$ MPa $500 < 400 = 300 < 200 = 100$ MPa $500 = 400 = 100 < 300 = 200$ MPa	Color ^d Lipolisis (AGL) ^e TD de GG
Temperatura	$50 < 25 < 4^\circ\text{C}$ $50 < 4 < 25^\circ\text{C}$ $4 < 50 = 25^\circ\text{C}$	Color Lipolisis (AGL) TD de GG
Tiempo	$10 < 30$ min	Color
^b Diámetro GG	^c $(9-10 = 8-9 = 7-8 = 6-7) < (5-6 = 4-5 = 4-3 = 3-4 = 2-3) < (1-2)$ μm	TD de GG

^a ($X < Y$) si diferencias significativas ($P < 0.05$), mayor letalidad en Y ; ($X = Y$) no diferencias significativas ($P > 0.05$).

^b Diámetro de los gÓbulos grasos.

^c Intervalos en micras de los glÓbulos grasos.

^d Lipolisis inducida (Ácidos Grasos Libres).

^e Tamaño y distribución de los glÓbulos grasos.

Tabla 19: Valores F en los parámetros fisicoquímicos estudiados.

Parámetros	Variables	Valores F ($P < 0.05$)
Color	Presión + Temperatura	78 % + 19 %
^a Lipolisis (AGL)	Temperatura	95 %
^b TD de GG	Presión + Temperatura	43 % + 41 %

^a Lipolisis inducida (Ácidos Grasos Libres).

^b Tamaño y distribución de los glÓbulos grasos.

8. ANEXO II

Quisiera hacer nota de varias aclaraciones que talvez por algún motivo u otro no fueron reflejadas en el apartado de material y métodos de cada una de las publicaciones que forman parte de este trabajo.

- Cada resultado expresado como promedio procede de 3 experiencias independientes y los análisis por duplicado ($n = 6$).
- Todas las muestras inoculadas: control y tratadas por altas presiones, fueron sembradas en medios de cultivo selectivos (Tabla 20, identificación) y en Plate Count Agar (PCA) (Figura 3). Las diferencias en recuentos entre los medios selectivos (b y c) y el PCA (b y c), en ningún caso fueron superiores a 0.2 unidades logarítmicas. Esto indicó que la contaminación inicial (después de la pasteurización) y la sufrida durante el proceso de preparación de las muestras no fue significativa.
- Después del proceso de pasteurización de la leche (75°C durante 1 min.) (Figura 3), necesario para reducir la contaminación inicial de los microorganismos aerobios mesófilos totales a niveles inferiores de 10^2 ufc/mL, se sembraron muestras de leche no inoculada (blancos) en PCA (a) y el medio selectivo (a), para cada uno de los microorganismos estudiados (Tabla 20, identificación). Los recuentos obtenidos en PCA (a) fueron siempre inferiores a 10^2 ufc/mL, mientras que en los medios selectivos (a), en ningún caso se detectó presencia de ningún microorganismo objeto de este estudio. Esto indicó que las muestras de leche, una vez fueron pasteurizadas, no contenían ya microorganismos de las cepas a estudiar antes de que éstas fueran inoculadas a propósito para su estudio por altas presiones.
- Todas las siembras en PCA (b y c) y los medios selectivos (b y c) para el recuento de supervivientes (Figura 3), se realizaron transcurridas aproximadamente 10 h desde su tratamiento por altas presiones, y siempre estuvieron almacenadas a temperatura de refrigeración (4°C). Este protocolo evita la aparición de falsos negativos que podrían generarse a causa de los posibles daños subletales sufridos por éstos bajo el efecto de las altas presiones (stress post-presurización).
- A su vez, para confirmar la ausencia de los microorganismos estudiados, las muestras tratadas por alta presión con recuentos en los medios selectivos (c) de 0 ufc/mL, éstas volvieron a ser sembradas en medios selectivos (d) tras haber pasado previamente un

período de incubación (tiempos y temperaturas óptimas para cada microorganismo) en el mismo bote donde la muestra fue tratada por alta presión (Figura 3).

- Para estudiar el posible efecto letal de la temperatura *per se*. Se realizaron diferentes experiencias que consistieron en tratar térmicamente muestras de leche de oveja (6% materia grasa), las cuales previamente fueron inoculadas de forma individual con cada uno de los microorganismos estudiados, a las temperaturas más extremas ensayadas con los tratamientos de altas presiones: 1 y 53 °C durante 30 min. en un baño M^a con agitación. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$), entre las muestras tratadas térmicamente y los controles. Así pues, no hubieron reducciones microbianas de las cepas estudiadas por el efecto de la temperatura *per se*.

Tabla 20: Microorganismos, medios de cultivo, temperaturas y tiempos utilizados en los ensayos microbiológicos.

	Stock	Rehidratación		Crecimiento		Identificación	
	4°C	Medio	T ^a /t	Medio	T ^a /t	Medio	T ^a /t
<i>E. coli</i>	NA	LB	37°C/24h	LB	37°C/24h	VRBA	37°C/24h
<i>P. fluorescens</i>	TSA	TSB	30°C/24h	TSB	30°C/24h	CVT	30°C/48h
<i>L. innocua</i>	BHI-A	BHI	37°C/24h	BHI	37°C/24h	LSA-S	37°C/48h
<i>S. aureus</i>	TSA	TSB	37°C/24h	TSB	37°C/24h	BP	37°C/48h
<i>L. helveticus</i>	MRS-A	MRS-B	37°C/24h	MRS-B	37°C/24h	MRS-A	37°C/72h

BHI: Brain Heart Infusion

NA: Nutrient Agar

BHI-A: Brain Heart Infusion Agar

MRS-A: Man-Rogosa-Sharpe Agar

BP: Baird Parker

MRS-B: Man-Rogosa-Sharpe Broth

CVT: Crystal-Violet-Tetrazolium Count

TSA: Tryptone Soya Agar

LB: Lactose Broth

TSB: Tryptone Soya Broth

LSA-S: Listeria Selective Agar-Supplement

VRBA: Violet Red Bile Agar