

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA



FACULTAT DE VETERINÀRIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS

**Proyecto de investigación para la obtención del título del Máster en Calidad de  
alimentos de origen animal**

**Título del proyecto**

**“EVALUACIÓN DEL USO DE LAS RADIACIONES ULTRAVIOLETA DE  
ONDA CORTA (UVC) COMO ALTERNATIVA A TRATAMIENTOS  
TÉRMICOS EN LA LECHE”**

**Autor:**

**Andrea Guevara Lozano**

**Directores:**

**Dra. Manuela Hernández**

**Sra. María Martínez**

**Dr. Ramón Gervilla**

**Dr. Artur X. Roig**

**Bellaterra (Barcelona)**

**2018**

## **Informe de los directores y supervisores del trabajo de investigación**

**Dr. Ramón Gervilla Fernández**, Responsable de Calidad del SPTA (Servei Planta Tecnologia dels Aliments) e Investigador en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**Dr. Artur Xavier Roig Sagués**, Profesor Titular en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**Dra. Manuela Hernández Herrero**, Profesora Titular en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**Sra. María Martínez García**, Doctoranda en el departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

### **INFORMAN**

Que el trabajo de investigación presentado por la **Sra. Andrea Guevara Lozano** y titulado “*Evaluación del uso de las radiaciones ultravioleta de onda corta (UV-C) como alternativa a tratamientos térmicos*” ha sido realizado bajo nuestra supervisión o dirección dentro del módulo Trabajo Fin de Máster del Máster Oficial de Calidad de Productos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste firmamos el presente informe a: *31 de Agosto del 2018*

Sra. María Martínez García

Dra. Manuela Hernández Herrero

Dr. Artur Xavier Roig Sagués

Dr. Ramón Gervilla Fernández

## AGRADECIMIENTOS

A Artur y Manoli les agradezco por darme la oportunidad de participar en este proyecto de investigación que me ayudo a adquirir nuevos conocimientos que me serán útiles no solo en el mundo profesional si no también para la vida.

A María le agradezco inmensamente por su dedicación y constante atención en la dirección de este proyecto, por estar pendiente siempre a cualquier duda que tuviera y por ayudarme a crecer profesionalmente.

A Ramón por ser un pilar importante durante toda esta etapa de aprendizaje y por siempre a estar dispuesto a escucharme, ser paciente y a explicarme una y otra vez cuantas veces fuera necesario.

A mis compañeros de máster por brindarme su amistad, por todas las experiencias vividas y por ser casi que una familia lejos de la mía.

Finalmente, a mis padres, por brindarme su amor y su apoyo incondicional en todo momento.

## Tabla de Contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Objetivo .....</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Obtención de la leche .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Microorganismos utilizados en este estudio e inoculación .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Tratamiento con UV-C .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Análisis microbiológicos.....</b>	<b>14</b>
2.6.1 Cálculo de la letalidad.....	14
<b>2.7 Análisis físico-químicos .....</b>	<b>15</b>
2.7.1 pH .....	15
2.7.2 Sólidos solubles totales .....	15
2.7.3 Colorimetría .....	15
2.7.4 Coeficiente de absorción a 254 nm .....	16
2.7.5 Densidad .....	16
2.7.6 Viscosidad.....	16
2.7.7 Turbidez.....	17
2.7.8 Acidez titulable .....	17
2.7.9 Pardeamiento no enzimático .....	17
2.7.10 Determinación de Hidroximetilfurfural .....	18
2.7.11 Oxidación proteica .....	18
<b>2.8 Análisis estadísticos.....</b>	<b>19</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Efecto de los tratamientos UV-C sobre las esporas de <i>Bacillus subtilis</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Efecto de los tratamientos UV-C sobre los parámetros físico-químicos .....</b>	<b>22</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>28</b>
<b>5. REFERENCIAS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. ANEXOS.....</b>	<b>34</b>

## ABSTRACT

Today, consumers are looking for safe food that meets all quality standards, but at the same time that are not much processed and maintain a high nutritional value. The high demand for this type of food has promoted the carrying out of numerous investigations on new technologies that allow to meet these needs, and obtain food with organoleptic attributes very similar to unprocessed foods. Shortwave ultraviolet radiation (UV-C) is one of these technologies. In this study the level of lethality of *Bacillus subtilis* spores inoculated in milk was evaluated when subjected to UV-C treatments with different doses and flow rates, as well as the effect on the physical-chemical properties of milk.

For the treatments of lethality of *B. subtilis* with UV-C, doses of (20, 40, 80, 100, 120 and 160 J / mL) were made at different flow rates (1, 300 and 500 RPM equivalent at 1.7-2.9, 41.9 and 64.6 mL/s, respectively). The results showed that with a dose of 100 J / mL and at a flow rate of 300 RPM, a reduction of up to 4- $\log_{10}$  can be achieved.

For the physical-chemical analysis crude milk was used, not homogenized, not standardized, nor heat treated and subjected to doses of (80 and 160 J / mL), with flow rates of 1 and 500 RPM, as well as, a series of thermal treatments, a pasteurization (65 °C / 30 min) and an autoclave sterilization (115 °C / 30 min) were carried out. The results showed significant changes for most of the physical-chemical parameters in the thermal treatments (pasteurization and sterilization) and in the milk that was submitted to single pass (1 RPM) and doses of 80 J / mL.

## RESUMEN

En la actualidad, los consumidores buscan alimentos seguros, que cumplan con todos los estándares de calidad, pero que a su vez estén poco procesados y mantengan un elevado valor nutricional. La alta demanda por este tipo de alimentos ha potenciado que se lleven a cabo numerosas investigaciones sobre nuevas tecnologías que permitan cumplir con estas necesidades, y obtener alimentos con atributos organolépticos muy parecidos a los alimentos sin procesar. La radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) es una de estas tecnologías. En este estudio se evaluó el nivel de letalidad de las esporas *Bacillus subtilis* inoculadas en leche al ser sometida a tratamientos UV-C con diferentes dosis y velocidades de flujo, así mismo el efecto sobre las propiedades físico-químicas de la leche.

Para los tratamientos de letalidad de *B. subtilis* con UV-C, se realizaron dosis de (20,40,80,100,120 y 160 J/mL) a diferentes velocidades de flujo (1, 300 y 500 RPM, equivalentes a 1.7-2.9, 41.9 y 64.6 mL / s, respectivamente). Los resultados mostraron que con una dosis de 100 J/mL y a una velocidad de flujo de 300 RPM se puede lograr una reducción de hasta 4- $\log_{10}$ .

Para los análisis físico-químicos se utilizó leche cruda no homogeneizada, no estandarizada, ni tratada térmicamente y se sometió a dosis de (80 y 160 J/mL), con velocidades de flujo de (1 y 500 RPM), al igual, se realizaron una serie tratamientos térmicos, una pasteurización (65 °C / 30 min) y una esterilización en autoclave (115 °C / 30 min). Los resultados mostraron cambios significativos para la mayoría de los parámetros físico-químicos en los tratamientos térmicos (pasteurización y esterilización) y en la leche que se sometió a dosis de 80 J/mL con un pase simple (1 RPM).

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los consumidores buscan alimentos seguros, que cumplan con todos los estándares de calidad, pero que a su vez estén poco procesados y mantengan un elevado valor nutricional. La alta demanda por este tipo de alimentos ha potenciado que se lleven a cabo numerosas investigaciones sobre nuevas tecnologías que permitan cumplir con estas necesidades, y obtener alimentos con atributos organolépticos muy parecidos a los alimentos sin procesar (Butz and Tauscher, 2002; Suárez-Jacobo *et al.*, 2011; Velázquez-Estrada *et al.*, 2013). Algunas de estas nuevas tecnologías, como son los campos eléctricos pulsantes, las tecnologías basadas en altas presiones, los ultrasonidos o la luz ultravioleta, entre otras, tienen aplicaciones muy específicas en función del tipo de alimento, que han hecho posible que algunas ya sean aplicadas por la industria, mientras que otras aún están en fase de investigación (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010). En este estudio la tecnología estudiada fue la radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) y el efecto que ésta puede provocar tanto en la letalidad microbiana como en los principales parámetros físico-químicos de la leche.

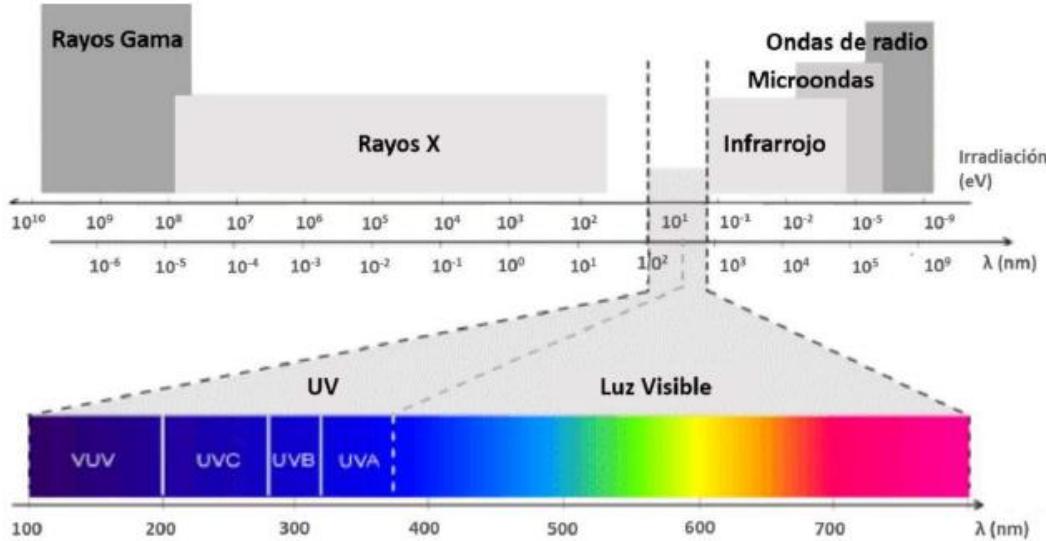
La leche es un líquido de color blanquecino proveniente de las glándulas mamarias de los mamíferos en buen estado de salud. Ésta se recolecta desde hace más de 6000 años y es un alimento básico de la alimentación humana, ya que proporciona nutrientes esenciales, es fuente de energía, proteínas de alta calidad y grasas. Además, contribuye en gran medida a la ingesta diaria necesaria de calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y ácido pantoténico. En la leche de vaca el agua es su principal componente, con un 87%, seguido de los azúcares (4,6%), la grasa (3,9%), y las proteínas (3,2%, destacando un 2,6% de caseínas) (Belitz, *et al.*, 2009). A nivel mundial, la leche de vaca es la que tiene mayor producción (83%), seguido por la leche de búfala (12,9%) y cabra (2,4%) (FAO, 2013).

En cuanto a sus propiedades físico-químicas, la leche es un líquido opaco, de color blanco, que se atribuye a la reflexión de la luz por las micelas de caseína, el fosfato de calcio en suspensión coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Las sustancias carotenoides y la riboflavina también tienen influencia sobre el color, ya que le confieren tonalidades amarillas y verdes, respectivamente (Belitz, *et al.*, 2009). La leche se comporta prácticamente como un fluido newtoniano con una viscosidad de 0,002 Pa·s a 20 °C. El punto de congelación, por efecto de los solutos (lactosa y sales), va

desde - 0,53 a - 0,55 °C, el cual es un valor de referencia en los análisis crioscópicos para identificar la adulteración de la leche. La acidez titulable normal es de 0,15 a 0,16 % de ácido láctico, el pH es de 6,50 a 6,75 y cualquier cambio en estos valores indica una alteración del producto. La densidad específica oscila entre 1,029 y 1,039 g/mL (15 °C), que disminuye con el aumento del contenido de grasa, y aumenta con el incremento de proteínas, lactosa y sales (Belitz, *et al.*, 2009; Badui, 2006).

La aplicación de radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) es una tecnología no térmica que ha generado recientemente un gran interés para la conservación de alimentos. La tecnología UV-C es fácil de usar y es letal para la mayoría de los microorganismos (Gayán *et al.*, 2013). Además, los tratamientos UV-C son potencialmente capaces de inactivar las esporas bacterianas (Hijnen *et al.*, 2006). Dentro del rango de UV-C hay 4 regiones del espectro electromagnético basadas en la longitud de onda (Bolton, 2004; Bolton and Cotton, 2011; Orlowska *et al.*, 2013) (Figura 1):

- **UV de vacío (100-200 nm):** Es absorbida por el agua o el oxígeno del aire. Se absorbe en unos pocos centímetros por el oxígeno del aire y conduce a la generación de ozono (O<sub>3</sub>).
- **UV-A de onda larga (315-400 nm):** Constituye el 98,7% de la radiación que proviene del sol y alcanza la superficie de la Tierra, siendo además la responsable de que se produzcan cambios en el color de piel.
- **UV-B de onda media (280-315 nm):** Es perjudicial para el ser humano, ya que causa quemaduras en la piel y es causante de cáncer, sin embargo, una fracción de la luz UV-B es la que induce la formación de la vitamina D en la piel.
- **UV-C de onda corta (200-280 nm):** Se absorbe por el ADN y ARN de los microorganismos y conduce a su inactivación por la creación de enlaces entre bases continuas del genoma, siendo la radiación de mayor interés en la conservación de alimentos por su efecto germicida (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010).



**Figura 1.** Espectro de radiación electromagnética con una división del espectro de luz visible y luz UV (Koutchma, *et al.*, 2009).

Algunos de los factores más importantes que pueden afectar a la letalidad de los tratamientos con UV-C son: la dosis de tratamiento, que depende de la intensidad aplicada y el tiempo de exposición; el patrón de flujo (turbulento o laminar); las características ópticas del medio (coeficiente de absorción) y por último, el tipo de microorganismo que se pretende eliminar (López-Malo y Palou, 2005; Franz *et al.*, 2009; Koutchma *et al.*, 2009). El principal factor limitante en la tecnología UV-C es su baja capacidad de penetración en alimentos líquidos con alto coeficiente de absorción (Koutchma *et al.*, 2009) lo que reduce su efectividad (Bintsis *et al.*, 2000; López-Malo and Palou, 2005; Koutchma *et al.*, 2007). La atenuación de la intensidad de la luz UV-C a través de un medio se describe en la ley de Lambert-Beer [Eq. 1]:

$$I = I_0 * e^{\alpha * d * c}$$

Donde  $I$  es la intensidad atenuada,  $I_0$  es la intensidad incidente de UV,  $d$  es la profundidad alcanzada por UV,  $\alpha$  es el coeficiente de absorción de un soluto y  $c$  es la concentración del soluto que absorbe.

De acuerdo a la ley de Lambert-Beer, la intensidad de la luz disminuye cuando la absorbancia aumenta (Willard *et al.*, 1965), así la efectividad de la UV-C disminuye en matrices con una absorbancia elevada. Una forma de minimizar este inconveniente es garantizar una distribución más homogénea de la radiación UV en el alimento líquido es

favorecer que circule con un flujo turbulento. Se ha demostrado que la inactivación bacteriana incrementa con la turbulencia cuando la dosis se mantiene constante (Koutchma *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006; Matak *et al.*, 2007). Las condiciones del flujo turbulento se describen matemáticamente con las unidades del número de Reynolds (Re). La Food and Drug Administration de los EE. UU (FDA, 2005) sugiere que se debe alcanzar un número Reynolds de al menos 2200 para asegurar el flujo turbulento para así garantizar una distribución más homogénea de la radiación UV en el alimento cuando circula por una sección tubular del reactor (Koutchma *et al.*, 2007; Gayán *et al.*, 2011). En la actualidad, se han diseñado equipos que emplean la tecnología UV-C en alimentos líquidos que circulan (con flujo laminar o turbulento) a través de un sistema de tubos situados alrededor de una lámpara de UV-C, que usualmente está protegida por un tubo de cuarzo para que el alimento no contacte con ninguna parte eléctrica de la lámpara, y que constituyen el denominado reactor UV-C empleado en este estudio (Patente Europea EP2965766-A1).

Los efectos de inactivación de la UV-C sobre los microorganismos se deben al daño fotoquímico producido en sus ácidos nucleicos. La radiación UV-C es absorbida por los nucleótidos, concretamente en los bloques constitutivos del ADN y ARN de la célula, según la longitud de onda, con los valores más altos entre 200 y 260 nm (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010; Wright and Cairns, 1998). El mecanismo de acción que produce la destrucción de los microorganismos debe a la penetración de luz UV-C a través de las membranas de las células que causa daños en su ADN debido a la formación de dímeros de timina que evitan que el ADN se replique o transcriba eventualmente, conduciendo al microorganismo a la muerte (Bank *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1999). La longitud de onda UV-C más eficiente frente a las bacterias es a 253.7 nm, en la que el ADN de los microorganismos tiene su máxima absorción (Koutchma *et al.*, 2009). En las bacterias esporuladas expuestas la luz UV-C producen fotoproductos (SPs) que provocan las lesiones más graves en su ADN (Moeller *et al.*, 2007). Aun así, hay mecanismos enzimáticos dentro de las células que son capaces de reparar una parte del daño causado al ácido nucleico. Debido a esto, es necesario utilizar dosis más altas para asegurarse de que el daño al ácido nucleico sea irreparable. La dosis de UV es el producto de la intensidad ( $\text{mW/cm}^2$ ) por el tiempo de exposición (s) reportado como  $\text{mW*s/cm}^2$ . Sin embargo, la dosis de UV también es expresada comúnmente como  $\text{mJ/cm}^2$  ya que  $1 \text{ mW*s} = 1 \text{ mJ}$  (Koutchma *et al.*, 2009).

Una de las ventajas del uso de la radiación UV-C como método de conservación es que es una tecnología limpia, que no genera residuos químicos, siendo una opción económica para la desinfección, ya que tiene un bajo consumo de energía y un bajo costo de inversión, funcionamiento y mantenimiento. Además, es un proceso por el cual no se requieren temperaturas altas y no genera daño térmico en el producto (Koutchma *et al.*, 2009). Sin embargo, entre sus desventajas en cuanto a su aplicación en los alimentos, se deben considerar los diferentes factores que afectan a su eficacia frente a los microorganismos; ya que depende de la dosis aplicada, la transparencia y la composición del alimento, de forma que la penetración de la luz disminuye cuando se trata líquidos opacos (a la luz UV-C) o tienen sólidos en suspensión. La baja transmitancia está asociada a la concentración inicial de microorganismos, partículas en suspensión y composición del producto (Koutchma *et al.*, 2009; Orlowska *et al.*, 2013). Respecto a los posibles inconvenientes sobre los alimentos, pueden producir cambios organolépticos pues, favorecen la oxidación de los lípidos a través de reacciones fotoquímicas, como se ha observado en carne y leche (Bolton, 2004).

## 1.2 Objetivo

Evaluar el nivel de supervivencia de las esporas de *Bacillus subtilis* inoculadas en leche, cuando son expuestas a diferentes tratamientos con radiación UV-C, así como el efecto de estos tratamientos sobre las principales propiedades físico-químicas de la leche.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de la leche

Para los estudios de inactivación de esporas de *B. subtilis* por UV-C se utilizó leche UHT entera comercial (3,5% materia grasa) envasada para su uso comercial, mientras que para los estudios sobre el efecto de la UV-C en las propiedades físico-químicas se utilizó leche cruda de vaca (4,2% materia grasa) no estandarizada, no homogeneizada, ni tratada térmicamente, proveniente de una granja cercana al laboratorio (Can Badó, La Roca del Valles, España).

### 2.2 Microorganismos utilizados en este estudio e inoculación

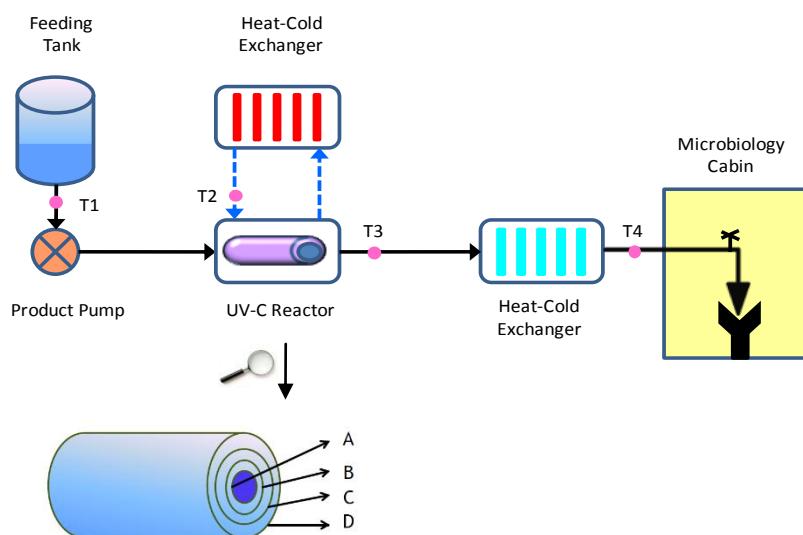
*B. subtilis*, es una bacteria Gram-positiva, en forma de bastón, formadora de esporas. Se seleccionó esta bacteria por ser uno de los microorganismos de referencia en tratamientos UV-C, debido a su facilidad y reproducibilidad en la obtención de esporas, así como a su resistencia moderada a la inactivación, al requerir aproximadamente 36 mJ / cm<sup>2</sup> para una reducción de 1 Log de su carga inicial (Chang *et al.*, 1985; FDA, 2000).

El microorganismo *B. subtilis* (CECT 5144) se adquirió como un cultivo liofilizado de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Paterna, España). Para la obtención de las esporas de *B. subtilis* se utilizó el método descrito en la norma UNE EN 13704:2002 (AENOR, 2002). Brevemente consistió en incubar en frascos Roux y con el medio agar extracto de levadura con manganeso (MYA) el microorganismo *B. subtilis* a 30 °C durante 7-21 días, hasta conseguir la máxima esporulación. Posteriormente, se separaron las formas vegetativas de las esporuladas tras realizar 4 lavados en agua destilada a 10000 g 20 min, para finalmente aplicar un tratamiento térmico a 75 °C / 30 min. La suspensión de esporas en agua se inoculó directamente en la leche a una concentración aproximada de 6 Log ufc/mL.

## 2.3 Tratamiento con UV-C

Todos los tratamientos fueron realizados en el servicio Planta Tecnológica de los Alimentos (SPTA) Facultad Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (España).

El equipo UV-C utilizado en este trabajo está compuesto por un depósito con capacidad para 1-2 L que alimenta al circuito mediante una bomba peristáltica Flowmaster FMT300 (ISMATEC Lab. GmbH, Wertheim-Mondfeld, Alemania) capaz de regular la velocidad de circulación del fluido y, por lo tanto, el tiempo que tarda en pasar a través de la sección del reactor UV-C (UV-Therm, Ypsicon S.L., Barcelona, España), que está formado por dos lámparas protegidas con un tubo de cuarzo con un diseño concéntrico (Figura 2). Cada lámpara UV-C tiene una potencia total de 55 W y una irradiancia de 41 mW/cm<sup>2</sup> a una longitud de onda de 254 nm. El alimento circula por el reactor formado una capa de un espesor de 1 mm. El volumen que puede irradiar simultáneamente cada lámpara del reactor es de aproximadamente 70 mL (Patente Europea EP2965766-A1). La temperatura del equipo UV-C se regula con un intercambiador “Hot-Cold” que puede regular el fluido a temperaturas desde 0 a 90 °C. Después de cada tratamiento, las muestras se recolectaron en tubos de plástico estériles de 15 mL y se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis.



**Figura 2.** I) Esquema del equipo UV-C. II) Tubo concéntrico en la parte interna del reactor: A; Lámpara UV-C, B; Tubo de cuarzo, C y D; Tubos de acero inoxidable. Entre

A y B circula aire para refrigerar la lámpara UV-C. Entre B y C circula el líquido (alimento) (1 mm de ancho) y entre C y D circula el fluido regulador de temperatura.

Antes de efectuar los tratamientos, se inoculó la leche entera UHT con las esporas de *B. subtilis* ( $5,9 \pm 0,4$  Log ufc/mL), y se sometió a diferentes tratamientos de UV-C a diferentes dosis de radiación UV-C (20, 40, 80, 100, 120 y 160 J/mL) y velocidades de flujo (1, 300 y 500 RPM), ver Anexo I Tabla 5 para la equivalencia en caudal (mL/s), a una temperatura de 20 °C. Para los análisis físico-químicos se sometió la leche cruda a una serie de tratamientos UV-C a dosis de (80 y 160 J/mL) y velocidades de flujo de (1 y 500 RPM) a una temperatura de 20 °C.

## 2.6 Análisis microbiológicos

Se tomó 1 mL de cada muestra de leche y se homogeneizó con 9 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Panreac, Castellar del Valles, España). Se realizó un banco de diluciones en la misma solución, sembrando 1 mL de cada dilución, por duplicado, en una placa de Petri con medio Triptona Soja Agar (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). El recuento de las esporas supervivientes de *Bacillus subtilis* se realizó tras incubar las placas a 37 °C durante 24 h.

### 2.6.1 Cálculo de la letalidad

La letalidad obtenida en cada tratamiento se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación: [Eq. 2]

$$\log_{10} \left[ \frac{N_0}{N+1} \right]$$

Donde  $N_0$  es el recuento inicial de esporas, expresadas en ufc/mL y  $N$  es el número de esporas supervivientes después de los tratamientos de UV-C, expresadas en ufc/mL. La curva de supervivencia para los tratamientos con UV-C se obtuvo trazando el logaritmo

de las fracciones de supervivencia ( $N_0 / N + 1$ ) frente a las dosis de tratamiento, expresadas en J/mL.

## 2.7 Análisis físico-químicos

Se tomo la leche cruda no estandarizada, no homogeneizada, ni tratada térmicamente y se sometió a una serie de tratamientos térmicos para ser comparados. Entre los tratamientos térmicos se realizó una pasteurización (65 °C / 30 min) y una esterilización en autoclave (115 °C / 30 min) simulando las esterilizaciones comerciales, pero en discontinuo, no en continuo como se realizaría a la leche UHT comercial (con otras temperaturas y tiempos), al finalizar estos tratamientos se realizaron los siguientes análisis:

### 2.7.1 pH

El pH se determinó con un pH-metro SensION™+ (HACH, Hospitalet de Llobregat, España) directamente en la muestra a 20 °C.

### 2.7.2 Sólidos solubles totales

Se utilizó un refractómetro de mano multiescala Zuzi Serie 300 (AUXILAB, Beriáin, España). La concentración de sólidos solubles totales se determinó a 20 °C, después de la calibración con agua destilada. La lectura se reportó directamente como ° Brix (% de sólidos solubles en la muestra).

### 2.7.3 Colorimetría

Se realizó con un colorímetro portátil Hunter Lab (MiniScan XETM, Hunter laboratory Inc., Reston, EEUU). Se obtuvieron valores según la escala CIE Lab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) donde, el valor de  $L^*$  (valores de 0 a 100) indica el grado de luminosidad, el valor  $a^*$  corresponde a la transición del color rojo (valores positivos) a verde (valores negativos) y  $b^*$  la transición del color amarillo (valores positivos) a azul (valores negativos).

La diferencia total del color entre la muestra control y cada muestra tratada se calculó mediante la siguiente fórmula: [Eq.3]

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L^*)^2 + (b_0 - b^*)^2 + (a_0 - a^*)^2}$$

Siendo,  $L_0$ : Luminosidad de la muestra Control;  $L^*$ : Luminosidad de la muestra tratada;  $b_0$ : Coordenada de cromaticidad de la muestra Control desde amarillo hasta azul;  $b^*$ : Cromaticidad de la muestra tratada desde amarillo hasta azul;  $a_0$ : Coordenada de cromaticidad de la muestra Control desde rojizo hasta verdoso y  $a^*$ : Cromaticidad de la muestra tratada desde rojizo hasta verdoso.

#### 2.7.4 Coeficiente de absorción a 254 nm

Para medir el coeficiente de absorción ( $A_{254}$ ) se determinó mediante un espectrofotómetro UV-Vis (Bionova, científica S.L., Barcelona, España) en una cubeta de cuarzo con un paso de luz de 10 mm, a 254 nm, realizando diluciones (1:9), hasta asegurar que la medición (absorbancia) de la muestra estaba dentro de los valores (0,2 - 0,8), y multiplicando finalmente los resultados por el factor de dilución correspondiente, representando los valores obtenidos en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.7.5 Densidad

La densidad de la leche se midió a 20 °C con un hidrómetro de densidad de grado comercial (Hydrometer – Aerometre HYDR-100-001, France) en una probeta de 250 mL.

#### 2.7.6 Viscosidad

Se midió la viscosidad relativa de la leche, contando el tiempo que demoraba la muestra en pasar por dos puntos concretos de un viscosímetro de Ostwald (modelo 1293, CIVEQ, Ciudad de México, México). Todas las mediciones se realizaron a 20 °C, expresando los valores obtenidos en centipoise (cps).

### 2.7.7 Turbidez

La turbidez se midió con un turbidímetro portátil (EPA) 2100Q (HACH, Hospitalet de Llobregat, España) diseñado de acuerdo al método de USEPA (180.1) tras diluir la leche con agua destilada. Los resultados de la turbidez se multiplicaron por el factor de dilución para obtener el resultado final en unidades NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez). Todas las mediciones se realizaron a 20 °C.

### 2.7.8 Acidez titulable

La acidez titulable total de la leche se determinó mediante la valoración con una solución estandarizada de Hidróxido de Sodio (NaOH) (Panreac) al 0,1 M. La muestra de leche se pesó en un vaso de precipitados y luego se mantuvo en agitación constante, midiendo su pH a medida que se añadía el NaOH lentamente hasta llegar a un pH de 8, registrándose el volumen de NaOH utilizado. Para expresar los resultados se utilizó la siguiente ecuación [Eq. 4]:

$$\% \text{ Acidez (g de ácido láctico / 100 ml leche)} = \frac{V(Mx) \times C(Mx) \times f (\text{ácido láctico}) \times 100}{C (\text{NaOH 0.1 M}) \times \text{masa de muestra (g)}}$$

Siendo V (Mx): Volumen de gasto de la solución de NaOH estandarizada; C (Mx): Concentración de la solución de NaOH estandarizada; C (NaOH 0.1M): Concentración ideal de la solución de NaOH (0,1M); f (ácido láctico): Factor de conversión de equivalencia de 1 ml de NaOH 0,1M a Ácido láctico anhídrido (0,009008 g).

### 2.7.9 Pardeamiento no enzimático

Para analizar el pardeamiento no enzimático de la leche se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugó a 800 g por 15 min en una centrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Luego se tomaron 2,5 ml del sobrenadante y se le adicionó 2,5 mL de etanol al 96% (Panreac), filtrando la mezcla con papel Whatman 42. Se realizaron varias diluciones (1:9) para ajustar la lectura a valores de absorbancia entre

0,2-0,8. El pardeamiento no enzimático se define como las unidades de absorbancia ( $\text{cm}^{-1}$ ) a 420 nm, multiplicados por su factor de dilución.

### 2.7.10 Determinación de Hidroximetilfurfural

Para la determinación de hidroximetilfurfural se realizó el método descrito por (Keeney & Bassette., 1959), donde se tomó 10 mL de leche en tubos de Pyrex de 20 ml y se le agregó 5 mL de ácido oxálico al 0,3 N (Panreac). La mezcla se calentó a 102 °C durante 1 hora en una estufa, y posteriormente los tubos se enfriaron con agua a fría hasta alcanzar una temperatura de 21 °C, tras lo que se les adicionó 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) al 40%. La mezcla se filtró con papel Whatman nº 42, tomando 4 mL del permeado, adicionándolos con 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich Química SL, Madrid, España) al 0,05 M. La mezcla se calentó en baño María por 40 min a 40 °C, dejándolo enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia de la mezcla a 443 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Bionova, científica S.L., Barcelona, España) en una cubeta de cuarzo de 10 mm. La concentración de HMF de las muestras se calculó con la siguiente ecuación [Eq. 5]:

$$[\text{HMF}] (\mu\text{mol/L}) = (A - 0,055) * 87,5$$

Donde  $A$  es la absorbancia ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida a 443 nm.

### 2.7.11 Oxidación proteica

Para determinar el grado de oxidación proteica se realizó una modificación del método de Levine *et al.* (1990) y Fenaille *et al.* (2006). Se mezcló 30  $\mu\text{L}$  de leche con 970  $\mu\text{L}$  de una solución 10 mM de 2 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Panreac, Castellar del Vallés, España) en 2 M de ácido clorhídrico (HCL) al 37% (Sigma-Aldrich) (volumen de 0,44 g de DNPH con 200 mL de HCL). La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se le agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) al 10 %, tras lo que se centrifugó durante 5 min a 7500 g. Posteriormente se lavó el pellet con 1 ml de una mezcla de etanol-etil acético 50/50 (v/v) y se repitieron

los pasos de centrifugado y lavado. Finalmente se disolvió el precipitado con 1 mL de urea al 6 % (Panreac). El contenido de proteína se determinó por espectrofotometría UV ( $\epsilon_{370 \text{ nm}} = 2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , donde  $\epsilon$  = absorbancia molar) con un espectrofotómetro UV- Vis a 370 nm. Los resultados se expresaron en nmol de carbonilo/mg de proteína y se calcularon con la siguiente ecuación [Eq. 6]:

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C$$

Donde, A: Absorbancia ( $\text{cm}^{-1}$ ) a 370 nm;  $\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar ( $\text{L/mol} \times \text{cm}$ ); L: Longitud de la cubeta en cm y C: Concentración de soluto en 1 litro de solución mol/L.

## 2.8 Análisis estadísticos

Los experimentos para determinar la letalidad de los tratamientos UV-C sobre las esporas de *B. subtilis* se realizaron de forma independiente tres veces, con un análisis por duplicado de las muestras en cada repetición ( $n = 6$ ). En el caso de los análisis físico-químicos, se realizaron dos experimentos independientes y las muestras se analizaron cinco veces para cada tratamiento. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante una ANOVA (Análisis de la Varianza) utilizando el procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales) mediante el software STATISTICA (sistema de software de análisis de datos), versión 7 (StatSoft, Inc., vs 2004). Se realizó el Test de Duncan para obtener comparaciones por pares entre medias de muestras. El nivel de significancia se estableció en  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

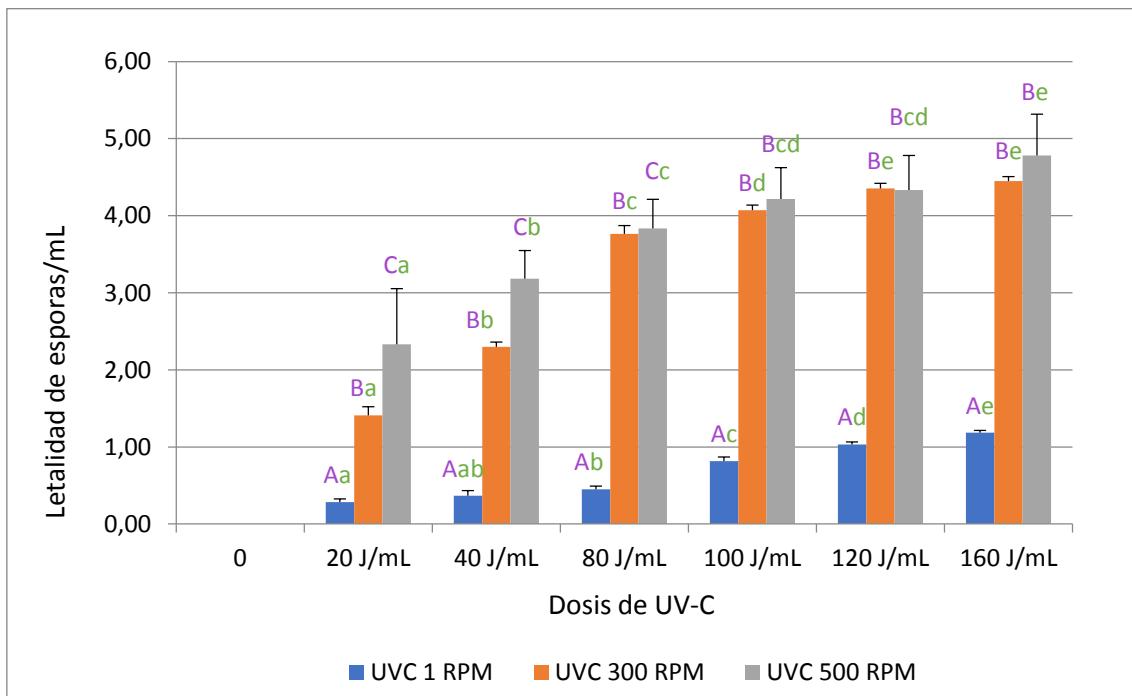
#### 3.1 Efecto de los tratamientos UV-C sobre las esporas de *Bacillus subtilis*

Como se puede observar en la Figura 1, cuando los tratamientos se aplicaron en un único pase por el reactor a una menor velocidad (1 RPM) independientemente de la dosis aplicada, el grado de inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* fue muy escaso, aunque aumentó significativamente cuando se incrementó la velocidad del flujo, y en consecuencia, el número de pasos por el reactor (300 y 500 RPM). La leche posee un elevado coeficiente de absorción, por lo que se requieren altas dosis de UV-C para poder inactivar las esporas de *B. subtilis*. Ello se relaciona con la ecuación de Lambert, de forma que la intensidad de la luz disminuye con el incremento de la absorbancia (Willard, et al., 1965), en consecuencia, la inactivación por UV-C disminuye cuando la matriz presenta una alta absorbancia, ya que la radiación UV-C no puede penetrar dentro de la matriz (Gayan, et al., 2013; Baysal, et al., 2013).

A bajas dosis (20 y 40 J/mL) se observaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en las letalidades obtenidas al aumentar las velocidades de flujo, aunque a partir de los 80 J/mL no se observaron diferencias al aumentar de 300 a 500 RPM. La letalidad observada a dosis entre 100 y 160 J/mL fue la máxima, superando los  $4\text{-Log}_{10}$  ufc/mL.

Se ha encontrado poca información sobre inactivación de bacterias esporuladas con UV-C en leche, aunque sí en otras matrices. Así, Gayan *et al.* (2013) en un estudio realizado en una solución tampón con un coeficiente de absorción de  $11.1\text{ cm}^{-1}$ , obtuvieron una reducción de  $2,93\text{-Log}_{10}$  de esporas de *Bacillus cereus* al aplicar a una dosis de 23,72 J/mL mientras que en nuestro estudio se alcanzó una reducción de  $2,33\text{-Log}_{10}$  a una dosis de 20 J/mL a la máxima velocidad de 500 RPM en leche con un coeficiente de absorción de  $400\text{ cm}^{-1}$ . Por otra parte, Choudhary *et al.* (2011) en leche cruda de vaca lograron una reducción de  $2,65\text{-Log}_{10}$  al aplicar una dosis de 107,6 J/mL, con un reactor con tubo en espiral, que generaba un flujo con un número de Reynolds de 713. En nuestro equipo, para conseguir un incremento en el número de Reynolds, se aumentó la velocidad de flujo (RPM) unido a realizar múltiples pasos, consiguiendo a 100 J/mL a 300 RPM una reducción de  $4,07\text{-Log}_{10}$  con un número de Reynolds de 749.

Los tratamientos UV-C fueron mucho más efectivos para inactivar este tipo de bacterias que otras tecnologías emergentes, como la UPHH. Amador *et al.* (2014) obtuvo una reducción de  $4,39\text{-Log}_{10}$  de esporas de *Bacillus subtilis* utilizando tratamientos UPHH a 300 MPa con una temperatura inicial de 75 °C, mientras que en nuestro estudio, obtuvimos una reducción de  $4,78\text{ Log}_{10}$  con la dosis de 160 J/mL a 300 RPM y a una temperatura de 20 °C.



**Figura 1.** Tasa de letalidad de esporas de *Bacillus subtilis* a diferentes dosis de UV-C (20, 40, 80, 100, 120, 160 J/mL) y diferentes velocidades de flujo (1, 300, 500 RPM). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. Las diferentes letras representan las diferencias significativas (P0.05), las letras mayúsculas son las diferencias entre diferentes RPM a una misma dosis de UV-C y las minúsculas representan diferencias entre diferentes dosis a una misma RPM.

### 3.2 Efecto de los tratamientos UV-C sobre los parámetros físico-químicos

En la Tabla 2 podemos observar el efecto de los diferentes tratamientos UV-C, comparados con tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización, sobre algunas de las propiedades físico-químicas de la leche.

Solo las muestras sometidas a tratamientos Esterilización y UV-C a 80 J/mL a 1 RPM presentaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en los valores de pH respecto al resto de tratamientos, en el resto de muestras tratadas el valor medio fue de 6,7, similar a lo referido por (Orlowska *et al.*, 2013) donde la media de pH fue de 6,68, demostrando así que la exposición continua al UV-C no afectó a la nuestra matriz. Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en cuanto a la acidez titulable. Estos parámetros cumplen con los valores requeridos según establece el Código Alimentario Español para una leche higienizada (CAE, 1967), en el que la acidez, expresada en g de ácido láctico/100 mL debe tener un máximo de 0,19. Aunque el pH de la leche se vio afectado por los tratamientos de Esterilización y 80 J/mL a 1 RPM, esto no afectó significativamente a la acidez, ya que diferentes muestras de leche pueden presentar distintos valores de pH y presentar una acidez similar y viceversa (Alais., 1988).

La densidad (Tabla 2) de la leche cruda es variable, oscilando los valores medios entre 1,027 g/mL y 1,033 g/mL. Los valores obtenidos de las leches tratadas se encuentran dentro de este intervalo, sin presentar diferencias significativas respecto al control, a excepción de la leche tratada por UV-C a 80 J/mL a 1 RPM (1,280 g/mL) y la leche esterilizada (1,185 g/mL), que mostraron una densidad significativamente mayor. En el caso de la leche Esterilizada, debido a que se esterilizó en una autoclave de laboratorio (donde no hay compensación de sobrepresión) y hay que dejar los tapones de las botellas de Pyrex sin cerrar herméticamente, podría haber ocurrido cierta evaporación del contenido del agua y ciertas desestabilizaciones proteicas y desestabilizaciones de la fase grasa, pudiéndose producir ciertas separaciones de las fases de la leche y alterar su lectura de densidad. Igualmente, ciertos fenómenos como los ocurridos en los tratamientos de Esterilización, podrían haber ocurrido en los tratamientos de un solo pase (1 RPM) que obliga a circular la muestra muy lentamente por el reactor y

favoreciendo los fenómenos de descremado o separación de fases, cabe recordar que la leche no estaba homogenizada. Con respecto al tratamiento de pasteurización, otros estudios previos mostraron resultados parecidos a los nuestros (Kasahara, Carrasco, & Aguilar, 2015) en los que la leche sometida a un proceso de pasteurización causa una evaporación insignificante del agua de composición y esto no afecta a su densidad. Lo mismo ocurre con los tratamientos de UV-C, ya que al ser tratamientos no térmicos no hay evaporación de agua y al circular a altas velocidades (300 y 500 RPM) evitan el fenómeno de descremado o separación de fases, por lo tanto, no se ve afectada su densidad.

**Tabla 2.** Efecto de diferentes tratamientos sobre los valores de pH, Acidez titulable (%) (g ácido láctico/100 mL), Densidad (g/mL) y Viscosidad (cps).

Tratamiento	pH	Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL),	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cps)
<b>Control</b>	6,67 ± 0,004a	0,13 ± 0,004a	1,033 ± 0,009 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,003 <sup>a</sup>
<b>80 J/mL - 500 RPM</b>	6,71 ± 0,002b	0,13 ± 0,023a	1,026 ± 0,0012 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,004 <sup>a</sup>
<b>160 J/mL - 500 RPM</b>	6,7 ± 0,002b	0,13 ± 0,022a	1,029 ± 0,0017 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,005 <sup>a</sup>
<b>Pasteurizada</b>	6,7 ± 0,009b	0,13 ± 0,014a	1,027 ± 0,0015 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,005 <sup>a</sup>
<b>Esterilizada</b>	6,51 ± 0,003d	0,14 ± 0,006a	1,185 ± 0,046 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>80 J/mL - 1 RPM</b>	6,47 ± 0,012c	0,14 ± 0,003a	1,280 ± 0,0 <sup>c</sup>	1,18 ± 0,05 <sup>b</sup>

Las letras minúsculas (a-f) representan las diferencias significativas ((P<0.05) entre los parámetros.

En la viscosidad (Tabla 2) los valores entre la leche Esterilizada y 80 J/mL a 1RPM son muy parecidos entre sí, pero se diferencian significativamente (P<0.05) de los demás tratamientos y del control. Comparado con otros estudios la viscosidad presentó valores con diferencias significativas entre la leche tratada con UV-C y el control (2,02 cp para el control y 1,99 cp para la leche tratada), los cambios en la viscosidad de la leche están relacionados con la modificación de proteínas y lípidos, aun así otros estudios no mostraron cambios significativos en la viscosidad de la leche y la funcionalidad de sus

proteínas al ser sometidos a radiaciones de UV-C (Elmnasser *et al.*, 2008, Orlowska *et al.*, 2013).

La Tabla 3 nos muestra que los tratamientos UV-C a dosis de 160 y 80 J/mL a 500 RPM no causaron diferencias significativas en cuanto a la absorbancia a 254 nm de la leche control, mientras que la dosis de 80 J/mL a 1 RPM causó un descenso significativo de la misma (171,17), en contraposición a la leche tratada térmicamente, en las que aumentó.

**Tabla 3.** Efecto de diferentes tratamientos sobre los valores de Absorbancia 254 nm ( $\text{cm}^{-1}$ ), Sólidos totales solubles (%) y Turbidez en leche cruda de vaca (NTU).

Tratamiento	Absorbancia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)	Sólidos totales solubles (%)
<b>Control</b>	$236,05 \pm 1.93^{\text{a}}$	$36362 \pm 525.38^{\text{a}}$	$9,21 \pm 0.10^{\text{a}}$
<b>80 J/mL - 500 RPM</b>	$226,79 \pm 20.46^{\text{a}}$	$40124 \pm 328.94^{\text{b}}$	$9,10 \pm 0.10^{\text{a}}$
<b>160 J/mL - 500 RPM</b>	$235,24 \pm 15.41^{\text{a}}$	$32396 \pm 155.67^{\text{e}}$	$9,00 \pm 0^{\text{a}}$
<b>Pasteurizada</b>	$290,65 \pm 21.17^{\text{b}}$	$68234 \pm 356.39^{\text{c}}$	$9,00 \pm 0^{\text{a}}$
<b>Esterilizada</b>	$326,95 \pm 8.36^{\text{b}}$	$70683 \pm 579.36^{\text{d}}$	$10,0 \pm 0^{\text{c}}$
<b>80 J/mL - 1 RPM</b>	$171,17 \pm 12.44^{\text{c}}$	$70683 \pm 579.36^{\text{d}}$	$8,50 \pm 0.16^{\text{b}}$

Las letras minúsculas (a-f) dentro de la misma columna representan las diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre las muestras.

En los tratamientos UV-C de 80 J/mL a 1 RPM y esterilizada se apreciaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en los valores de sólidos totales solubles respecto al control, mientras que para los demás tratamientos no se observó ninguna diferencia (Tabla 3). En la turbidez se observaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en todas las muestras con respecto al control, así como con las muestras esterilizada y UV-C de 80 J/mL a 1 RPM. En las muestras esterilizadas el incremento de la turbidez (Tabla 3), pudiera haber sido debido al efecto térmico del tratamiento el cual conllevaría a la desnaturización de proteínas séricas formando complejos que pudieran interferir en la refracción de la luz, mientras que en el caso del tratamiento con dosis de 80 J/mL a 1 RPM ese

incremento de la turbidez pudiera haber sido debido a fenómenos de separación de fases de la leche durante el tratamiento en el reactor ya que la leche no estaba homogeneizada.

**Tabla 4.** Efecto de diferentes tratamientos sobre los valores de Color en leche con diferentes tratamientos (Media ± desviación estándar).

Tratamiento	Color			
	L*	a*	b*	ΔE*
<b>Control</b>	71,81 ± 17,95 <sup>a</sup>	-1,27 ± 0,34 <sup>a</sup>	6,82 ± 1,70 <sup>a</sup>	
<b>80 J/mL - 500 RPM</b>	86,52 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,01 <sup>d</sup>	8,78 ± 0,01 <sup>ab</sup>	4,33 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>160 J/mL - 500 RPM</b>	83,424 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,02 <sup>d</sup>	8,62 ± 0,02 <sup>ab</sup>	7,03 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>Pasteurizada</b>	90,22 ± 0,003 <sup>a</sup>	-0,54 ± 0,01 <sup>c</sup>	10,69 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,44 ± 0,03 <sup>d</sup>
<b>Esterilizada</b>	85,392 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,20 <sup>b</sup>	15,92 ± 0,02 <sup>c</sup>	9,90 ± 0,10 <sup>e</sup>
<b>80 J/mL - 1 RPM</b>	89,504 ± 0,008 <sup>a</sup>	-0,47 ± 0,01 <sup>c</sup>	8,96 ± 0,04 <sup>ab</sup>	1,23 ± 0,02 <sup>f</sup>

Valores de media ± desviación estándar. Las letras minúsculas (a-f) dentro de una misma columna representan las diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre los parámetros. **L\***: luminosidad; **a\***: rojizo a verdoso; **b\***: amarillo a azul; **ΔE**: diferencia de color total.

La Tabla 4 muestra los resultados de los parámetros relativos al color, donde se observa que para el parámetro **L\*** ninguno de los tratamientos causó diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la luminosidad, mientras que para los parámetros **a\*** y **b\***, sí que se observaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ). En todos los tratamientos hubo un incremento en el valor **a\***, aunque en la leche pasteurizada y tratada a 80 J/mL a 1 RPM el parámetro **a\*** se mantuvo con tonos más verdosos, mientras que en los demás tratamientos las muestras mostraron tonos más rojizos. El valor **b\*** aumentó en todos los tratamientos con respecto al control, indicando un viraje hacia un tono más amarillento, excepto los tratamientos UV-C a 80 J/mL 1 RPM que no causaron cambios significativos respecto a la leche control. Respecto al efecto de los tratamientos sobre **ΔE\***, que nos indica las desviaciones totales del color (donde se considera que a partir de un valor de 5 es apreciable por el ojo humano), todos los tratamientos aumentaron el valor, aunque tan solo superaron el valor de 5 (apreciable por el ojo humano), la leche tratada por UV-C a 160 J/mL y 500 RPM y la leche esterilizada, que presentó el valor

más elevado (9,90). Según Semagoto *et al.* (2014), en pruebas de color realizadas en leche tratadas con radiación UV, se observó que las muestras de leche que fueron sometidas a oxidación presentaron un descenso en el valor L\*, mientras que para la leche que no sufrió oxidación no se observó ningún cambio en este valor, tal como observamos en las muestras de nuestro estudio.

**Tabla 5.** Efecto de diferentes tratamientos sobre los valores de Pardeamiento no enzimático ( $\text{cm}^{-1}$ ), Hidroximetilfurfural (HMF) ( $\mu\text{mol/L}$ ) y Oxidación Proteica (nmol de carbonilo/mg de proteína) en leche con diferentes tratamientos (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamiento	Oxidación proteica	HMF	Pardeamiento no enzimático
<b>Control</b>	750 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	12,56 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	32,61 $\pm$ 0.75a
<b>80 J/mL - 500 RPM</b>	3625 $\pm$ 9.81 <sup>b</sup>	8,312 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	56,86 $\pm$ 0.12c
<b>160 J/mL - 500 RPM</b>	3795 $\pm$ 52.8 <sup>c</sup>	12,56 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	26,94 $\pm$ 0.08e
<b>Pasteurizada</b>	355 $\pm$ 10.9 <sup>f</sup>	11,35 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	50,46 $\pm$ 0.51b
<b>Esterilizada</b>	5787 $\pm$ 13.7 <sup>e</sup>	64,20 $\pm$ 0.23 <sup>e</sup>	28,35 $\pm$ 0.08f
<b>80 J/mL - 1 RPM</b>	4625 $\pm$ 7.81 <sup>d</sup>	6,23 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	26,11 $\pm$ 0.15d

Las letras minúsculas (a-f) dentro de la misma columna representan las diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre los parámetros de las muestras.

La Tabla 5 muestra los resultados de la oxidación proteica, donde se observa que todos los tratamientos causaron un aumento significativo ( $P<0.05$ ) de la concentración de carbonilos de proteína, a excepción de la leche pasteurizada, donde hubo una disminución de su concentración. La formación de carbonilos de proteínas y enlaces cruzados de ditirosina son buenos indicadores del efecto de la oxidación de proteínas en la estructura primaria de la proteína, que a su vez puede afectar a su estructura terciaria (Dalsgaard *et al.*, 2007). Para el tratamiento de esterilización se obtuvo el valor más alto (5787 nmol/mg), debido al sometimiento prolongado a altas temperaturas que desencadenan una reacción que modifica las proteínas de la leche, formando lo que se conoce como oxidación proteica. Esta oxidación se puede originar debido a las diferentes reacciones que afectan a aminoácidos como triptófano, metionina, cisteína y residuos de lisina, entre otros (Guy & Fenaille, 2006). En un estudio realizado por Semagoto *et al.* (2014), donde sometieron a un concentrado de proteína a radiaciones UV, se observaron resultados muy parecidos, apreciando un incremento de la oxidación

de las proteínas en la muestras sometidas a radiación UV a una temperatura cercana a la nuestra (25 °C). El contenido de carbonilo de las proteínas aumentó en función del tiempo de irradiación, algo que se puede también observar en nuestro estudio donde las muestras sometidas a los tratamientos UV-C 80 J/mL a 500 RPM presentaron valores significativamente inferiores a las tratadas a 160 J/mL a 500 RPM, aunque en ambos casos la formación fue significativamente inferior a la observada en la leche tratada a 80 J/mL a 1 RPM.

En la leche tratada por Esterilización presentó el valor más elevado de HMF (64,20  $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que en las muestras tratadas por UV-C se observó un descenso significativo ( $P<0.05$ ) de la concentración, excepto en la leche tratada a 160 J/mL y 500 RPM, que no presentó cambios significativos ( $P>0.05$ ) con respecto al control (Tabla 5). El aumento de producción de HMF en el tratamiento de esterilización se debe en gran parte a los procesos térmicos a los que se somete la leche. Estos resultados son similares a los que se observaron en el estudio de Ferrer *et al.* (2000) que obtuvieron en leche esterilizada con resultados entre 21,65 y 66,44  $\mu\text{mol/L}$ . En otro estudio (Rada & Rojas, 2008) realizado en leches esterilizada comerciales con espectrofotometría UV-Vis se indicaron valores parecidos a la leche esterilizada (81,21  $\mu\text{mol/L}$ ) pero en este caso también debido a las condiciones de higienización y de almacenamiento de la leche. El fenómeno de reducción del HMF en los tratamientos UV-C ya había sido descrito anteriormente en miel (Roig-Sagués *et al.*, 2018), y se debe probablemente a que el HMF se ha convertido en otro compuesto, aunque sería necesario realizar un análisis cromatográfico para determinar cuál.

#### 4. CONCLUSIONES

- El efecto de la radiación UV-C para la leche ha demostrado ser efectivo para la inactivación de esporas microbianas, aunque es necesario el uso de una dosis de al menos 100 J/mL y un flujo de 300 RPM para lograr reducciones de al menos 4- $\text{Log}_{10}$ .
- Los tratamientos UV-C aplicados con flujos elevados causaron leves modificaciones, en los parámetros físico-químicos de pH, acidez titulable, densidad, viscosidad, absorbancia a 254 nm y turbidez. Los tratamientos térmicos, como la esterilización, causaron cambios significativos en la mayoría de los casos.
- Los tratamientos UV-C aplicados con flujos elevados modificaron los parámetros de color de la leche cruda, pero en menor medida que los tratamientos aplicados en un único paso y que los tratamientos de esterilización.
- Aunque todos los tratamientos aplicados aumentaron el grado de oxidación proteica de la leche, los tratamientos UV-C aplicados con flujos elevados presentaron un menor incremento que los tratamientos aplicados en un único pase, y que los tratamientos térmicos de esterilización.
- En general, los tratamientos UV-C redujeron o no modificaron la concentración de HMF de la leche. En las leches tratadas esterilizadas este valor se incrementó significativamente.

## 5. REFERENCIAS

Alais, C. (1998). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera, 4ta edición. Ciudad de México. 4: 185-187

Amador-Espejo, G. G.; Hernández-Herrero, M. M.; Juan, B.; Trujillo, A. J. (2014). Inactivation of *Bacillus* Spores Inoculated in Milk by Ultra High-Pressure Homogenization. *Food Microbiology* 44: 204-210

Badui, S. (2006). Química de los Alimentos. Ed S. Badui. Pearson, 4ta edición. Ciudad de México, México.

Bank, H.L., John, J., Schmehl, M.K.S., Dratch, R.J. (1990). Bactericidal Effectiveness of Modulated UV Light. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3888–3889.

Barbosa-Cánovas, G. V. & Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Improving the safety and quality of milk, other milk preservation technologies: ultrasound, irradiation, microwave, radio frequency, ohmic heating, ultraviolet light and bacteriocins. Ed. G. Barbosa Cánovas, Woodhead Publishing Inc., Londres, Reino Unido.

Baysal, A.H., Molva, C., Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International Journal of Food Microbiology* 166: 494–498.

Belitz, H. D.; Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Food Chemistry. Eds H. Berlitz, W. Grosch y P. Schieberle. Springer, 4ta edición. Berlín, Alemania. 4: 498-519.

Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 637-645.

Bolton, J. R. (2004). Fundamentals of ultraviolet treatment. Terms and definitions do matter. *IUVA News* 6: 27-30.

Bolton, J. R. & Cotton, C. A. (2011). The Ultraviolet Disinfection Handbook. Eds J.Bolton y C. Cotton. American Water Works Association, Denver, United States.

Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*.

Chang JC, Ossoff , SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD. (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1361–1365.

Choudary, R., Bandla, S., Watson, G.D., Haddock, J., Abughazaleh A., Bhattacharya, B. (2011). Performance of coiled tube ultraviolet reactors to inactivate Escherichia coli W1485 and Bacillus cereus endospores in raw cow milk and commercially processed skimmed cow milk.

Dalsgaard, T. K., D. Otzen, J. H. Nielsen, and L. B. Larsen. (2007). Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation. *J. Agric. Food Chemistry* 55:10968–10976.

Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español (Boletín Oficial del Estado, núm. 248, de 17 de octubre de 1967). BOE-A-1967-16485 Texto Consolidado. Última modificación 17 de diciembre de 2016. Consultado abril de 2017. Disponible en: <http://www.boe.es/buscar/pdf/1967/BOE-A-1967-16485-consolidado.pdf>

Elmnasser, N., Dalgalarondo, M., Orange, N., Bakhrouf, A., Haertle, T., Federighi, M., Chobert, J.M., 2008. Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids. *J. Agric. Food Chemistry*.

EPA, Environmental Protection Agency. (1993). Method 180.1: Determination of Turbidity by Nephelometry.

FAO, Food and Agriculture Organization (2013). Leche y productos lácteos, segunda edición. Roma, Italia.

FDA, Food and Drug Administration. (2000). 21 CFR Part 179. Irradiation in the production, processing and handling of food. *Fed. Regist.* 65, 71056-71058.

FDA, Food and Drug Administration (2005). Irradiation in the production, processing and handling of food. <https://bit.ly/2OPgtVo>

Fenaille, F., Parisoda, V., Visanib, P., Populairea, S., Tabetc, J. C., & Guya, P. A. (2006). Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *International Dairy Journal*.

Ferrer, E., Alegría, A., Courtois, G., & Farré, R. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *Journal of Chromatography A*.

Gayán, E., Álvarez, I., Condón, S. (2013) Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19: 140–145.

Guy, P. A., & Fenaille, F. (2006). Contribution of mass spectrometry to assess quality of milk-based products. *Mass Spectrometry Review. Water Research* 40: 3–22.

Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 40: 3–22.

Kasahara, I., Carrasco, V., & Aguilar, L. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* in goat milk using pulsed ultraviolet light. *Journal of Food Engineering*.

Keeney, M., Bassette, R., (1959). Detección de compuestos intermedios en las primeras etapas de la reacción de pardeamiento en productos lácteos. *Journal of Dairy Science* 42: 945-960.

Koutchma T, Keller S, Chirtel S, Parisi B (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 179-189.

Koutchma, T.; Parisi, B. & Patazca, E. (2007). Validation of UV coiled tube reactor for fresh juices. *Journal of Environmental Engineering and Science* 6: 319-328.

Koutchma, T., Forney, L.J., Moraru, C.I. (2009). *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. CRC Press, New York.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., et al. (1990). Determination of protein carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478.

López - Malo, A. & Palou, E. (2005). Ultraviolet Light and Food Preservation. En Novel Food Processing Technologies. Ed. G. Barbosa-C. novas. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos. pp: 405-422.

Matak KE, Sumner SS, Duncan SE, Hovingh E, Worobo, RW, Hackney C.R., Pierson MD (2007). Effects of ultraviolet irradiation on chemical and sensory properties of goat milk. *Journal of Dairy Science* 90: 3178-3186.

Miller, R., Jeffrey, W., Mitchell, D. and Elasri, M. 1999. Bacteria responses to ultraviolet light. *American Society for Microbiology News* 65: 534-541.

Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, Berger T, Rettberg P, Doherty AJ, Horneck G., Nicholson WL (2007). Role of DNA Repair by Non-homologous and Joining in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Extreme Dryness, Mono- 29 and Polychromatic UV, and Ionizing Radiation. *Journal of Bacteriology* 189: 3306-3311.

Murakami EG, Jackson L, Madsen K, Schickedanz B (2006). Factors Affecting the Ultraviolet Inactivation of *Escherichia Coli* K12 in Apple Juice and a Model System\*. *Journal of Food Process Engineering* 29: 53-71.

Orlowska, M., Koutchma, T., Grapperhaus, M., Gallagher, J., Schaefer, R., & Defelice, C. (2013). Continuous and Pulsed Ultraviolet Light for Nonthermal Treatment of Liquid Foods. Part 1: Effects on Quality of Fructose Solution, Apple Juice, and Milk. *Food and Bioprocess Technology* 6: 1580-1592.

Rada, M., & Rojas, S. (2008). Determinación de 4-O- $\beta$ -D-Galactopiranosil-D-Fructofuranosa (Lactulosa) y 5-( Hidroximetil)-2-Furaldehído (HMF) en leches UHT comerciales colombianas por espectrofotometría ultavioleta-visible. *Alimentos Hoy*.

Reverter, L., Sauceda, JN., Codina-Torella, I., Hernández-Herrero, M.M., Gervilla, R., Roig-Saqués, A.X. (2018). Inactivation study of *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Aspergillus niger* spores under Ultra-High-Pressure Homogenization, UV-C light and their combination.

Semagoto, H. M., Liu, D., Koboyatau, K., Hu, J., Lu, N., Liu, X., ... Zhou, P. (2014). Effects of UV induced photo-oxidation on the physicochemical properties of milk protein concentrate. *Food Research International* 6: 582-583.

Willard H, Merritt L and Dean J (1965). Ultraviolet and visible absorption methods, Chapter 4. In *Instrumental Methods of Analysis*, 4th Ed., D. Van Nostrand Co, Inc., New York., NY.

Wright, H. B., & Cairns W. L. (1998). Ultraviolet light. Trojan Technologies Inc: 1- 28.

## 6. ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla 5 de conversión de unidades para RPM.

RPM	Nº Reynolds	Caudal mL/s
1	1-52	1,71-2,9
300	749	41,87
500	1150	64,6

**Anexo 2.** Tabla 6 de conversión de dosis con unidades de 1 J/mL.

Tiempo	Dosis						
	Segundos	mJ/cm <sup>2</sup>	J/cm <sup>2</sup>	mJ/mL	J/mL	mJ/L	J/L
1 "		31	0.03	298	0.3	298.043	298
6 "		186	0.19	1.788	1.8	1.788.257	1.788
12 "		372	0.37	3.577	3.6	3.576.514	3.577
24 "		744	0.74	7.153	7.2	7.153.029	7.153
36 "		1.116	1.12	10.730	10.7	10.729.543	10.730
48 "		1.488	1.49	14.306	14.3	14.306.057	14.306