



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Homogeneización de Leche a Alta Presión y Su Efecto Sobre Características Físico-Químicas, Microbiológicas y Sensoriales de Queso Fresco

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Alimentos

Presenta:

Héctor Ruiz Espinosa

Asesores:

Dra. Jesús Ofelia Angulo Guerrero

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dr. Jorge Welti Chanes

H. Veracruz Ver.

Mayo 2017

A Dios

A Mónica, Ana y Samuel, mi razón para superarme, mis bendiciones, mi todo.

A mis padres, por forjarme y ser ejemplo de amor delicado y honesto

A mis tías Carmen y Concepción, por ser mamás de repuesto

A Guillermo, Oscar, Peques, mis hermanos, cómplices y responsables de algunos
de los mejores momentos de mi vida

A mis amigos de todas épocas

A mis estudiantes

Gracias infinitas

RECONOCIMIENTOS

A mis asesores, por su guía y apoyo a lo largo de todo el proyecto

A todos los miembros del jurado; sus contribuciones fueron de suma utilidad para mejorar este trabajo

A todas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis, con especial mención para el Dr. Genaro Amador sin cuya ayuda las sesiones interminables de trabajo simplemente no hubieran ocurrido.

A la Dra. Xadeni Villegas, por su ayuda en la sección de evaluación sensorial

A la Dra. María Eugenia Bárcenas, de la Universidad de las Américas-Puebla, por su apoyo irrestricto y su amistad

Al Dr. Irving Ruiz, por su apoyo en el diseño experimental y análisis de datos

Al Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil, por todas las facilidades para realizar una parte de este proyecto y por su confianza y amistad

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo otorgado mediante una beca doctoral

RESUMEN

Ruiz Espinosa, Héctor DC Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Noviembre 2016. **HOMOGENEIZACIÓN DE LECHE A ALTA PRESIÓN Y SU EFECTO SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE QUESO FRESCO** Asesores: Dr. Jesús Ofelia Angulo Guerrero, Dr. Hugo Sergio García Galindo y Dr. Jorge Welti Chanes.

La homogeneización a alta presión (HAP) de leche permite reducir su carga microbiana, inactivar enzimas selectas y modificar la estructura de proteínas y lípidos, lo cual puede incrementar el rendimiento de productos derivados como el queso. Aunque se han reportado cambios fisicoquímicos y bioquímicos en quesos elaborados con leche HAP, no se han realizado estudios sensoriales descriptivos de ésta o de productos derivados. En este estudio se definieron procesos de pases múltiples de HAP (PMHAP) de leche a 210-250 MPa, equivalentes a una pasteurización térmica en términos de letalidad microbiana, se estudiaron posibles alteraciones fisicoquímicas y sensoriales de éstas y se evaluó su uso como materia prima para elaborar queso fresco. Se trató leche bovina cruda (3%) a PMHAP (210 MPa, 5 pases; 250 MPa, 4 pases) comparando sus características fisicoquímicas (color, tamaño micelar de caseína, tamaño y carga proteica de glóbulo graso, desnaturalización proteica) con las de leche cruda y con éstas se elaboraron quesos Panela. Se compararon propiedades selectas (color, textura, pH y microestructura) de quesos de leche PMHAP con aquellas de quesos de leche HTST al día 1 y durante 21 días de almacenamiento refrigerado, evaluando además factores de eficiencia quesera (rendimiento, sinéresis, composición de suero). Un panel entrenado evaluó leche y quesos PMHAP, mediante pruebas sensoriales descriptivas. Las leches PMHAP fueron más azules, con menor tamaño micelar y mayor desnaturalización proteica que el control. El tamaño del glóbulo graso y el área superficial específica disminuyeron significativamente, mientras que la carga proteica se incrementó hasta 10 veces. Los quesos de leche MPHAP a 250 MPa, con 4 pases exhibieron apariencia general, composición, microestructura y pH

similares a quesos HTST. No se observaron diferencias significativas en color de los quesos evaluados, aunque parámetros de textura de quesos MPHAP disminuyeron en mayor medida que los HTST durante el almacenamiento refrigerado. El rendimiento y la eficiencia de recuperación proteica se incrementaron en quesos MPHAP, mientras que sinéresis y grasa en suero aumentaron. Los atributos sensoriales (gusto, aroma, textura) de quesos HTST y MPHAP difirieron notoriamente. El procesamiento de leche por MPHAP puede representar una alternativa viable para producir queso fresco.

ABSTRACT

Ruiz Espinosa, Héctor DC Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. January 2017. **HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION OF MILK AND ITS EFFECT ON PHYSICOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF UNRIPENED CHEESE** Advisers: Jesús Ofelia Angulo Guerrero D.Sc., Hugo Sergio García Galindo Ph.D., Jorge Welti Chanes D.Sc.

High pressure homogenization (HPH) of milk allows reducing microbial load, inactivating selected enzymes and modifying proteins and lipids structure which in turn might increase yield in products such as cheese. Although physicochemical and biochemical changes in HPH-milk cheeses have been reported, no descriptive sensory analysis have been conducted on HPH milk products. In this study, 210-250 MPa- multiple-pass HPH treatments (MPHPH) of milk equivalent to a thermal pasteurization in terms of microbial lethality were defined; physicochemical and sensory changes in MPHPH-treated milk were studied and its use as unripened cheesemilk was evaluated. Raw bovine 3%-fat milk was MPHPH-treated (210 MPa, 5 passes; 250 MPa, 4 passes), comparing its physicochemical features (color, casein micelle and milk fat globule size, protein load, protein denaturation) with those of raw milk; then, MPHPH milks were used for elaborating Panela cheese. Selected MPHPH milk cheese properties (color, texture, pH, microstructure) were evaluated and compared with HTST milk cheeses at day 1 and throughout refrigerated storage; besides, cheesemaking efficiency factors (yield, syneresis, whey composition) were evaluated. A trained panel evaluated both MPHPH milk cheeses using sensory descriptive tests. MPHPH cheeses were bluer, with a reduced micellar size and increased protein denaturation compared to HTST milk. Milk fat globule size and specific surface area were significantly reduced while protein load increased up to 10-fold. 4-pass, 250 MPa HPH milk cheeses exhibited similar appearance, composition, pH and microstructure to HTST milk cheeses. No significant differences in color were observed between experimental and control cheeses although texture parameters of MPHPH milk cheeses reduced at a significantly higher rate during

storage than those of their HTST counterparts. Yield, protein recovery, fat losses and syneresis were higher in MPPH milk cheeses while sensory attributes (flavor, aroma, texture) of HTST and both MPPH milk cheeses notoriously differ. MPPH of milk might be used as an alternative for unripened cheese manufacture.

CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
CONTENIDO	VIII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 TRATAMIENTOS TÉRMICOS VS TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS	4
2.2 APLICACIÓN DE ALTA PRESIÓN EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS	8
2.2.1 <i>Fundamentos</i>	8
2.2.2 <i>Clasificación de procesos a alta presión</i>	11
2.2.2.1 <i>Procesos de alta presión hidrostática</i>	11
2.2.2.2 <i>Procesos de alta presión dinámica</i>	15
2.3 EFECTOS DEL PROCESAMIENTO A ALTA PRESIÓN EN LECHE	24
2.3.1 <i>Inactivación microbiana</i>	25
2.3.1.1 <i>Factores microbianos</i>	26
2.3.1.2 <i>Tipo de matriz alimenticia</i>	29
2.3.1.3 <i>Parámetros de proceso</i>	31
2.3.2 <i>Procesos a alta presión e inocuidad microbiana de leche</i>	33
2.3.3 <i>Cambios en actividad enzimática</i>	38
2.3.4 <i>Efectos sobre componentes de la leche</i>	43
2.3.4.1 <i>Cambios proteicos</i>	43
2.3.4.2 <i>Cambios en balance mineral</i>	51
2.3.4.3 <i>Cambios en glóbulos de grasa</i>	53
2.3.5 <i>Efectos asociados a cambios en proteínas lácteas</i>	57
2.3.6 <i>Cambios en atributos sensoriales</i>	61
2.3.7 <i>Efecto sobre propiedades de elaboración de queso</i>	63
2.3.8 <i>Uso como pretratamiento para elaboración de queso</i>	69
2.4 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO	72
3. METODOLOGÍA	75
3.1 PLAN DE INVESTIGACIÓN.....	75
3.1.1 <i>Etapa 1</i>	75
3.1.2 <i>Etapa 2</i>	77
3.1.3 <i>Etapa 3</i>	77
3.1.4 <i>Etapa 4</i>	78
3.1.5 <i>Etapa 5</i>	78

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
3.2.1 <i>Materiales</i>	78
3.2.2 <i>Procesamiento de leche</i>	79
3.2.3 <i>Elaboración de queso panela</i>	80
3.2.4 <i>Métodos de análisis de leche fluida</i>	80
3.2.5 Métodos fisicoquímicos de análisis de queso panela.....	88
3.2.6 Análisis sensorial descriptivo.....	91
3.2.7 Métodos de análisis de leche fluida.....	94
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
4.1 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE PARÁMETROS DE PROCESO HAP EN LECHE FLUIDA.....	97
4.2 ESTUDIO DE REDUCCIÓN DE CARGA MICROBIANA EN LECHE MEDIANTE PASES MÚLTIPLES DE HAP.....	106
4.3 DETERMINACIÓN DE CAMBIOS FISICOQUÍMICOS EN LECHE HAP Y HTST.....	120
4.4 ELABORACIÓN DE QUESO PANELA CON LECHE PASTEURIZADA TÉRMICAMENTE Y POR PASES MÚLTIPLES DE HAP.....	141
4.5 ANÁLISIS SENSORIAL DE LECHE Y QUESO PANELA HAP.....	161
4.5.1 <i>Selección de panel</i>	161
4.5.2 <i>Análisis descriptivo de leches HAP y HTST</i>	162
4.5.2.1 <i>Análisis descriptivo de aroma de leches HAP y HTST</i>	162
4.5.2.2 <i>Análisis descriptivo de gustos de leches HAP y HTST</i>	166
4.5.2.3 <i>Análisis descriptivo de sensación bucal de leches HAP y HTST</i>	166
4.5.3 <i>Análisis descriptivo de quesos elaborados con leche HTST y tratada por PM de HAP</i>	170
4.5.3.1 <i>Análisis descriptivo de aroma de leches HAP y HTST</i>	170
4.5.3.2 <i>Análisis descriptivo de gustos de leches HAP y HTST</i>	175
4.5.3.3 <i>Análisis descriptivo de sensación bucal de leches HAP y HTST</i>	176
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	180
6. BIBLIOGRAFÍA.....	183
7. APÉNDICES.....	201
ANEXO 1. PRUEBAS DE SELECCIÓN Y ENTRENAMIENTO DEL PANEL SENSORIAL.....	201
ANEXO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	205
ANEXO 3. PUBLICACIÓN RELACIONADA CON LA TESIS.....	300

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 2.1. Productos comerciales tratados con alta presión</i>	9
<i>Tabla 2.2. Cambio de volumen asociado con formación de enlaces e interacciones moleculares</i> .	11
<i>Tabla 2.3. Principales efectos del PAPH sobre los alimentos</i>	14
<i>Tabla 2.4. ΔV^{\ddagger} y Z_p de microorganismos, fosfatasa alcalina, viscosidad y color de leche sometida a presurización</i>	15
<i>Tabla 2.5. Homogeneizadores de alta presión disponibles comercialmente</i>	23
<i>Tabla 2.6. Sensibilidad al PAPH de patógenos inoculados en leche entera</i>	35
<i>Tabla 3.1. Pruebas microbiológicas en leche cruda y UHT inoculada</i>	88
<i>Tabla 4.1. Reducción de BMAs en leche entera cruda por HAP a diferentes presiones de operación y temperaturas de entrada</i>	98
<i>Tabla 4.2. Rendimiento de queso panela elaborado con leche HAP a diferentes presiones de operación y temperaturas de entrada</i>	100
<i>Tabla 4.3. Incremento de rendimiento de queso panela elaborado con leche HAP con respecto a quesos HTST</i>	100
<i>Tabla 4.4. Reducción de BMA en leche procesada a PM de HAP a 250 MPa</i>	101
<i>Tabla 4.5. Rendimiento de quesos de leche con pases múltiples (PM) de HAP a 250 MPa y diferentes T_i</i>	103
<i>Tabla 4.6. Análisis de perfil de textura de quesos de leche con PM de HAP a 250 MPa a diferentes T_i</i>	105
<i>Tabla 4.7. Reducciones observadas y predichas de BMAs por HAP a presiones y número de pases específicos</i>	108
<i>Tabla 4.8. Reducciones observadas y predichas de <i>S. aureus</i> por HAP a presiones y número de pases específicos</i>	109
<i>Tabla 4.9. Reducción de cuentas de coliformes en leche entera cruda tratada por HAP a presiones (P) y número de pases (N) específicos</i>	111
<i>Tabla 4.10. Cambios porcentuales en tiempo de coagulación por renina (TCR) y rendimiento potencial (RP) de leche tratada por PM de HAP vs leche cruda</i>	117
<i>Tabla 4.11. Cambios de parámetros de color en leche entera cruda tratada por HAP a presión (P, MPa) y número de pases (N) específicos</i>	123
<i>Tabla 4.12. Cambio en valores promedio* de tamaño de glóbulo graso en leche entera cruda tratada por PM de HAP</i>	126

<i>Tabla 4.13. Cambio en valores promedio de superficie específica de grasa en leche entera cruda tratada por PM de HAP</i>	<i>127</i>
<i>Tabla 4.14. Cambio en valores promedio de proteína total en membrana y carga proteica de glóbulo graso en leche entera cruda y a pases selectos de HAP</i>	<i>127</i>
<i>Tabla 4.15. Temperatura de desnaturalización* de BLG calculada a partir de termogramas de leche bovina sometida a PM de HAP a 250 MPa</i>	<i>140</i>
<i>Tabla 4.16. Rendimiento de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o pasteurizada HTST</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 4.17. Composición de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. Pasteurizados.....</i>	<i>144</i>
<i>Tabla 4.18. Composición de suero de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o pasteurizada HTST</i>	<i>145</i>
<i>Tabla 4.19. Sinéresis y pérdida de peso tras 21 días de almacenamiento de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs HTST</i>	<i>148</i>
<i>Tabla 4.20. Evolución de dureza (Kg) en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>154</i>
<i>Tabla 4.21. Evolución de cohesividad en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>156</i>
<i>Tabla 4.22. Evolución de elasticidad en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>157</i>
<i>Tabla 4.23. Evolución de L en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>158</i>
<i>Tabla 4.24. Evolución de a en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 4.25. Evolución de b en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 4.26. Evolución de hue (radianes) en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>160</i>
<i>Tabla 4.27. Evolución de índice cromaticidad (C*) en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado</i>	<i>160</i>
<i>Tabla 4.28. Evolución de ΔE en quesos Panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. HTST durante 21 d de almacenamiento</i>	<i>161</i>
<i>Tabla 4.29. Valores propios de factores para variables de aroma de leche</i>	<i>163</i>
<i>Tabla 4.30. Características aromáticas de leche tratada por PM de HAP</i>	<i>164</i>
<i>Tabla 4.31. Valores propios de factores para variables de gustos de leche</i>	<i>166</i>
<i>Tabla 4.32. Características en gustos de leche tratada por HTST o pases múltiples de HAP</i>	<i>168</i>

<i>Tabla 4.33. Valores propios de factores para sensación bucal de leche</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 4.34. Valores propios de factores para variables de aroma de queso</i>	<i>171</i>
<i>Tabla 4.35. Características en aromas de quesos HAP vs HTST</i>	<i>173</i>
<i>Tabla 4.36. Valores propios de factores para sensación bucal de leche</i>	<i>174</i>
<i>Tabla 4.37. Características en gustos de quesos HAP vs HTST</i>	<i>177</i>
<i>Tabla 4.38. Valores propios de factores para variables de textura de quesos Panela</i>	<i>177</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1. Funcionamiento de un equipo de PAPH por compresión indirecta</i>	13
<i>Figura 2.2. Estructura de válvulas de homogeneización y cambio en el tamaño y la distribución de partícula de glóbulos de grasa de leche bovina</i>	18
<i>Figura 2.3. Glóbulo de grasa de leche bovina sometida a homogeneización</i>	19
<i>Figura 2.4. Distribución de tamaño de glóbulo de grasa en leche cruda y homogeneizada</i>	20
<i>Figura 2.5. Materiales de válvulas de homogeneización.</i>	21
<i>Figura 2.6. Diseño geométrico y flujo en válvulas de homogeneización</i>	22
<i>Figura 2.7. Esquema de funcionamiento de homogeneizador Stansted con dos intensificadores</i>	25
<i>Figura 2.8. Cambios en la apariencia de leche tratada térmicamente y presurizada</i>	60
<i>Figura 3.1. Diagrama general del plan de investigación</i>	75
<i>Figura 3.2. Procedimiento de elaboración de queso Panela</i>	80
<i>Figura 3.3. Escala de intensidad de atributos para pruebas descriptivas</i>	94
<i>Figura 4.1. Quesos de leche con PM de HAP a 250 MPa a diferentes T_i, tras 10 d de almacenamiento refrigerado</i>	103
<i>Figura 4.2. Gráficas de contorno para reducción predicha por HAP de BMAs y <i>S.aureus</i></i>	115
<i>Figura 4.3. Evolución de pH en leche entera cruda tratada por pases múltiples de homogeneización a alta presión en comparación con leche pasteurizada</i>	121
<i>Figura 4.4. Cambio en tamaño de GG (D_{43}) de leche sometida a PM de HAP a 250 MPa y 210 MPa</i>	125
<i>Figura 4.5. Micrografías de leche entera cruda y a PM de HAP a 250 y 210 MPa</i>	130
<i>Figura 4.6 Espectros de infrarrojo en la región media de proteínas lácteas</i>	132
<i>Figura 4.7 Comportamiento espectral de leche tratada a PM de HAP a 210 MPa y 250 MPa</i>	134
<i>Figura 4.8. Separación de proteínas de leche sometida a pm de HAP por electroforesis nativa</i>	136
<i>Figura 4.9 Densitogramas de proteínas lácteas en leche bovina</i>	137
<i>Figura 4.10. Desnaturalización de betalactoglobulina por PM de HAP</i>	138
<i>Figura 4.11. Termograma de leche entera sometida a PM de HAP a presiones selectas</i>	140

<i>Figura 4.12. Cambio en pH durante el almacenamiento refrigerado de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST</i>	<i>150</i>
<i>Figura 4.13. Quesos panela elaborados con leche tratada por diferentes métodos de conservación</i>	<i>151</i>
<i>Figura 4.14. Queso panela elaborado con leche HAP a 210 MPa y HTST</i>	<i>152</i>
<i>Figura 4.15. Micrografías SEM de quesos panela elaborados con leche tratada por diferentes métodos de conservación</i>	<i>153</i>
<i>Figura 4.16. Perfiles de aromas de leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>162</i>
<i>Figura 4.17. ACP en aromas de leches tratadas</i>	<i>164</i>
<i>Figura 4.18. Perfiles de gustos de leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>166</i>
<i>Figura 4.19. ACP en gustos de leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>167</i>
<i>Figura 4.20. ACP en sensación bucal de leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>170</i>
<i>Figura 4.21. Perfiles de aromas de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>171</i>
<i>Figura 4.22. ACP en sensación bucal de leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>173</i>
<i>Figura 4.23. ACP en sensación bucal de leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>174</i>
<i>Figura 4.24. ACP en gustos de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>176</i>
<i>Figura 4.25. Perfiles de textura de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP</i>	<i>177</i>
<i>Figura 4.26. ACP de textura de quesos HAP vs HTST</i>	<i>178</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Alpha caseína
ACP	Análisis de componentes principales
ALA	α -lactalbúmina
ASB	Albúmina bovina sérica
BCN	Beta caseína
BLG	β -lactoglobulina
BMA's	Bacterias mesófilas aerobias
CEP	Campos eléctricos pulsados
CN	Caseína
CRA	Capacidad de retención de agua
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FA	Fosfatasa alcalina
FCC	Fosfato de calcio coloidal
FG	Firmeza de gel
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
GG	Glóbulo de grasa
HAP	Homogeneización a alta presión
HHST	Pasteurización de alto impacto térmico, tiempo muy corto
HP	Homogeneizadores de presión
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
HTST	Pasteurización a alta temperatura y tiempo corto
L, L*	Luminosidad
LLP	Lipasa lipoproteica
LP	Lactoperoxidasa
LPO	Lactoperoxidasa
LTLT	Pasteurización a baja temperatura y tiempo largo
MGG	Membrana de glóbulo de grasa
NP	Número de pases
NPAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras
P	Presión

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAP	Procesamiento a alta presión
PAPH	Procesamiento a alta presión hidrostática
PM	Pases múltiples
PS	Proteínas de suero
RP	Fase reversa
S	Factor de reducción logarítmica
SEM	Microscopía óptica de barrido
TCR	Tiempo de coagulación por renina
TDM	Tasa de disociación micelar
Ti	Temperatura de entrada
TM	Tamaño micelar
TPA	Análisis de perfil de textura
Ts	Temperatura de salida
UFC	Unidades formadoras de colonia
UHT	Ultrapasteurización
US	Ultrasonido
VFC	Velocidad de firmeza de cuajada

1. INTRODUCCIÓN

La pasteurización es el tratamiento térmico más frecuentemente usado para eliminar microorganismos patógenos y gran parte de enzimas y microorganismos deteriorativos en leche; está sustentada en estudios termobacteriológicos validados y es altamente efectiva en términos económicos, pues el equipo de proceso empleado regularmente (pasteurizador de placas) permite recuperar 80-90% del calor suministrado (Kelly *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que los procesos térmicos pueden conllevar cambios selectos en las propiedades fisicoquímicas, reológicas, microestructurales y sensoriales de leche fluida y, en consecuencia, de otros productos lácteos, como el queso. Los efectos de procesos térmicos en leche sobre la elaboración de queso han sido vastamente estudiados (Grappin y Beuvoir, 1997). Algunos de los efectos reportados son incremento de rendimiento, variaciones en la composición, cambios en los perfiles de maduración, inactivación o activación enzimática, modificación de los parámetros de manufactura (relacionados generalmente con variaciones en los tiempos de coagulación y cortado) y deterioro de características sensoriales. En consecuencia, se han propuesto distintas opciones no térmicas de conservación de leche, que mantengan el mismo nivel de inocuidad del producto sin comprometer su calidad sensorial, funcional y nutricional. Entre ellos, el procesamiento con altas presiones (100-1000 MPa) es la tecnología con más aplicaciones industriales en la actualidad. Sin embargo, la naturaleza discontinua de la mayoría de los equipos comerciales ha limitado su implementación en sistemas fluidos. Actualmente, se evalúa a la homogeneización a alta presión (HAP) como una alternativa viable para el procesamiento no térmico continuo de leche y se estudia su uso en la fabricación de queso (Escobar *et al.*, 2011). La HAP se basa en el mismo principio que la homogeneización convencional, pero trabaja a presiones considerablemente más altas (hasta 400 MPa). La HAP puede ofrecer múltiples ventajas potenciales para el procesamiento de leche; por el componente térmico asociado al proceso, faculta para realizar operaciones de pasteurización y

homogeneización simultáneas. Estudios previos demuestran que la HAP reduce la carga microbiana, inactiva enzimas lácteas selectas, disminuye el tamaño de los glóbulos grasos y altera las interacciones de éstos con caseínas y proteínas de suero, lo cual puede permitir la fabricación de quesos con características funcionales únicas. La magnitud de los cambios observados en leche varía de manera considerable en función de parámetros de proceso (presión de operación, número de ciclos, temperatura de entrada (T_i) y tipo de válvula del equipo) y propiedades del fluido, particularmente viscosidad y pH. Se ha reportado una mayor reducción en la población de bacterias patógenas y deteriorativas en leche al incrementar la presión de operación y el número de pases (Vachon *et al.*, 2002; Thiebaud *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha observado una reducción en la actividad de enzimas nativas de leche por efecto de la HAP, particularmente las proteolíticas, mientras que las lipasas no se ven considerablemente afectadas (Hayes y Kelly, 2003b; Pereda *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque se han reportado procesos HAP equivalentes a tratamientos térmicos desde el punto de vista de reducción de flora nativa (Pereda *et al.*, 2006), vida de anaquel refrigerada (Pereda *et al.*, 2007) o de seguridad alimentaria (Smiddy *et al.*, 2007) no se han obtenido procesos HAP sin una contribución térmica reducida que produzcan una reducción análoga a la pasteurización térmica en la población de microorganismos nativos en leche. Por otra parte, no hay reportes de estudios sensoriales descriptivos aún cuando hay evidencia reciente de cambios en perfiles de volátiles de leche HAP en comparación con leche pasteurizada y ultrapasteurizada (Pereda *et al.*, 2008a).

La HAP puede modificar variables del proceso en la elaboración de variedades selectas de queso (tiempo de coagulación, firmeza de cuajada), del producto terminado (composición, rendimiento) y de la maduración (cambios en textura y velocidad de lipólisis y proteólisis). Dentro de los beneficios reportados al emplear leche procesada por HAP como materia prima para elaboración de queso se incluye la posibilidad de incrementar el rendimiento, ya sea por mayor capacidad de retención de agua, por incorporación de proteínas séricas o por el incremento de la firmeza de cuajada al corte, lo que permite minimizar la pérdida de partículas finas. Sin embargo, a la fecha sólo se han publicado dos estudios sobre cambios inducidos por HAP en

Introducción

quesos de alta humedad (la categoría de quesos donde se encuentran las aplicaciones más frecuentes de homogeneización convencional), ambos recientes (Escobar *et al.*, 2011; Zamora *et al.*, 2012b); además, no se ha realizado un estudio sensorial descriptivo sobre las características sensoriales de quesos HAP y su relación con pruebas instrumentales selectas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tratamientos térmicos vs. tratamientos no térmicos en el procesamiento de leche fluida

Desde hace décadas la inocuidad es un tema prioritario para la industria alimenticia. Con este propósito, los procesadores siguen tres enfoques básicos de conservación: prevenir el ingreso de microorganismos patógenos a los alimentos, eliminar estos últimos si han tenido acceso al producto y evitar o reducir su crecimiento cuando las dos primeras estrategias han tenido un éxito parcial (Gould, 2000). A la fecha, dentro de los métodos de eliminación, los tratamientos térmicos son el procedimiento estándar para asegurar la inocuidad e incrementar la vida de anaquel de la mayoría de productos alimenticios, debido a su probada efectividad y excelente relación costo-beneficio. Sin embargo, la calidad sensorial y nutricional de los alimentos procesados térmicamente puede verse comprometida; los cambios asociados a la aplicación de calor han sido intensamente estudiados, especialmente en productos de alto consumo, como la leche. En términos generales, los tratamientos térmicos más intensos (p.e enlatado, UHT) permiten prolongar la vida de anaquel de alimentos selectos en mayor medida que los tratamientos moderados (como pasteurización), aunque esto conlleva mayores modificaciones en la calidad sensorial, funcional y nutricional de los productos. Algunos nutrientes y los componentes relacionados con la aceptabilidad sensorial (compuestos volátiles, pigmentos) se ven afectados por el calor; asimismo, las propiedades texturales o reológicas de los alimentos pueden variar drásticamente (Fellows, 2000). Esto, aunado a una clara tendencia de consumo hacia productos percibidos como *naturales*, ha potenciado la investigación enfocada al desarrollo de tecnologías alternativas conocidas como *no térmicas*. Entre las más relevantes se encuentran: ozonificación, campos eléctricos pulsados (CEP), plasma frío, pulsos de luz de alta intensidad, ultrasonificación, carbonatación, luz ultravioleta, alta presión, entre otros (Barbosa-Cánovas, Tapia y Cano, 2005; Rastogi, 2010; Deeth

y Datta, 2011a). Estas tecnologías se encuentran en diferentes etapas de evolución; desde aquellas que cuentan con productos en el mercado (alta presión, CEP) hasta otras que actualmente son experimentales; sin embargo, todas comparten un objetivo común: la obtención de productos con una vida útil adecuada, sin alteraciones sensoriales y nutrimentales significativas, enfocados a un mercado global creciente que demanda productos procesados con características similares a las de los frescos y están dispuestas a pagar por ello.

La leche posee una composición rica en nutrientes (azúcares fermentables, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc); por ello, resulta adecuada para el desarrollo de diversos tipos de microorganismos patógenos y deteriorativos. Para asegurar su conservación, el procesamiento de leche fluida tradicionalmente incluye la aplicación de tratamientos térmicos. Dentro de éstos se destacan la termización (subpasteurización realizada para disminuir la flora microbiana en leche previo a su almacenamiento refrigerado), pasteurización (diversas condiciones, destacándose 63°C, 30 min y 72°C, 15 s, identificadas como LTLT y HTST, respectivamente, por sus siglas en inglés) y esterilización comercial (135-140°C, 2-5 s) (Kelly *et al.*, 2005). La estabilidad microbiológica y enzimática de la leche se incrementa de manera importante con la aplicación de dichos tratamientos térmicos, aunque sólo los dos últimos garantizan la inocuidad del producto. La pasteurización es el método de conservación estándar de leche; este proceso resulta del calentamiento uniforme de cada partícula del producto y busca la destrucción de todos los microorganismos patógenos, coliformes y la mayoría de los psicrótrofos, sólo sobreviviendo los mesófilos termorresistentes (Buffa, 2003). Originalmente implementada para reducir los riesgos de contagio de tuberculosis a través de leche, la pasteurización se lleva a cabo hoy en día de acuerdo a condiciones predeterminadas de proceso (LTLT; HTST; HHST, higher heat, shorter time, p.e 94°C, 0.1 s) que garanticen la reducción de 5 ciclos logarítmicos en las cuentas de *Coxiella burnetii*, el microorganismo patógeno más termorresistente (NACMCF, 2006; FDA, 2011). Sin embargo, se han reportado diversos cambios biológicos, químicos y fisicoquímicos en leche durante el procesamiento térmico y su posterior almacenamiento refrigerado; estos impactan negativamente sus propiedades nutrimentales, sensoriales y/o tecnológicas. Aunque dependientes de

Antecedentes

la intensidad de las condiciones de proceso (tiempo, temperatura), algunos de los más relevantes incluyen: reducción de la velocidad de cremado, cambios en la membrana del glóbulo graso, formación de lactulosa, incremento reversible de la insolubilidad del fosfato de calcio (conversión a fosfato de calcio coloidal), destrucción parcial de vitaminas termolábiles, cambios en actividad enzimática, desnaturalización de proteínas séricas y, aunque poco frecuentes, cambios estructurales en caseínas (Fox y McSweeney, 1998). Por tanto, se ha propuesto emplear tecnologías no térmicas como una alternativa de conservación de leche, ya sea como un método único, o acoplado con tratamientos térmicos a temperaturas no letales (conocidos tratamientos mixtos).

Las principales tecnologías no térmicas que se han explorado como alternativas de procesamiento de leche y productos lácteos son CEP, ultrasonificación, radiación ultravioleta, carbonatación y procesamiento a alta presión (PAP). Con CEP, Fluory *et al.* (2006) reportan una reducción limitada en la carga microbiana inicial de leche cruda (1.4 ciclos \log_{10}) y modificaciones estructurales en caseínas de menor magnitud. Mejores resultados se han obtenido empleando los CEP acoplados con otras barreras de conservación. En términos generales se han logrado 4-5 reducciones \log_{10} en cuentas de bacterias no esporuladoras en procesos térmicos de baja intensidad (50-55°C) asistidos por CEP a 20 kV/cm. De igual manera, una pasteurización HTST asistida por CEP se ha reportado como una alternativa para producir leche con vida de anaquel extendida (ESL) superior a 60 días de almacenamiento refrigerado (Deeth y Datta, 2011b). Tratamientos mixtos de CEP (30-50 KV/cm, 30 pulsos, 3-4 Hz) y calentamiento (73-80°C, 6 s) se sugieren para duplicar la vida de anaquel de leche descremada, en comparación con leches CEP o pasteurizada (Fernández-Molina *et al.*, 2005); sin embargo, se han detectado cambios en concentración de compuestos volátiles en leche CEP al compararse con leche pasteurizada, particularmente aldehídos y cetonas (Zhang *et al.*, 2010), lo cual puede provocar alteraciones en sabor y flavor y disminuyan su aceptabilidad sensorial (Barbosa-Canovas y Bermudez-Aguirre, 2010). Otro problema potencial de CEP en leche radica en la necesidad de aplicar tratamientos considerablemente más intensos para lograr una inactivación enzimática significativa. Los CEP también se han probado de manera conjunta con

Antecedentes

antimicrobianos naturales. Calderón-Miranda *et al.* (1999) reportan reducciones de hasta 3.8 ciclos \log_{10} empleando CEP en leche adicionada con una bacteriocina (nisina). Por su parte, Smith *et al.* (2002a) lograron 7 reducciones \log_{10} en cuentas de microorganismos nativos de leche cruda mediante un tratamiento mixto de CEP (80 KV/cm, 50 pulsos de 2 s) y calentamiento moderado (52°C), con la incorporación de lisina y lisozima.

El ultrasonido (US) se ha aplicado en el procesamiento de leche como una técnica alterna de homogeneización; la disminución de carga microbiana asociada al uso de US es muy baja para emplearse como barrera única de conservación (Chouliara *et al.*, 2010; Engin y Karagul Yuceer, 2012); sin embargo, se han obtenido resultados alentadores con termosonicación (pasteurización térmica de leche asistida por US a 400W, 24KHz), dado que además del incremento en la letalidad del proceso se han observado cambios microestructurales en proteínas y glóbulos grasos que pueden ser favorables para modificar características funcionales y sensoriales de productos derivados como queso y yogurt (Riener *et al.*, 2009; Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2010).

Otras tecnologías emergentes se han empleado en el procesamiento de leche; por ejemplo, existen reportes sobre el efecto antimicrobiano de luz ultravioleta sobre leche cruda (Smith, 2002b). Krishnamurthy *et al.* (2007) emplearon distintas combinaciones de distancia de exposición, número de pases y velocidad de flujo de leche para establecer condiciones óptimas para la reducción de cuentas de *Staphylococcus aureus* (0.5 - 7.26 \log_{10}) en leche cruda tratada con luz ultravioleta. Por otra parte, Barbosa-Cánovas *et al.* (2000) analizaron la tecnología de arco de descarga pulsado como una alternativa de pasteurización de leche; con este proceso, basado en la aplicación de electricidad en alimentos fluidos, se han logrado reducciones de 5 a 7 \log_{10} en cuentas microbianas en leche, aunque se requiere recabar más información para corroborar su efectividad. El dióxido de carbono se emplea comúnmente en la industria láctea como método bacteriostático para alargar la vida de anaquel de leche cruda durante su transporte. Werner y Hotchkiss (2006) emplearon CO₂ supercrítico presurizado como método no térmico de conservación de leche; 132 g/kg de CO₂ supercrítico a 35°C, presurizado a 20.7 MPa permitió la reducción de más de 5 ciclos \log_{10} en la

población microbiana psicrótrófa nativa de leche cruda. Por su parte, el procesamiento a alta presión se considera como uno de los métodos emergentes más promisorios para la conservación de leche y productos lácteos y se ha estudiado intensamente en los últimos 20 años; esta tecnología se revisará a detalle en la sección siguiente.

2.2. Aplicación de alta presión en el procesamiento de alimentos

2.2.1. Fundamentos

Los efectos de la alta presión sobre la inactivación microbiana se conocen desde finales del siglo XIX; en 1895, H. Roger describió procesos a alta presión capaces de eliminar bacterias; sin embargo, B.H. Hite se considera el pionero en la aplicación de alta presión para conservar productos alimenticios, como leche (reducciones de $6 \log_{10}$ en cuentas de microorganismos nativos, a 650 MPa) (Hite, 1899) y diversos productos vegetales, como jugos de frutas (Hite *et al.*, 1914). Aunque ampliamente usada desde entonces en otras industrias (cerámica, metalurgia) el procesamiento de alimentos a alta presión fue revalorado y tomó auge hasta los 1990's, cuando los primeros productos presurizados se comercializaron en Japón. A la fecha, los productos procesados por alta presión se pueden ubicar en alguna de las siguientes categorías: jugos de frutas y otras bebidas; cárnicos precocidos listos para consumirse, rebanados o enteros; vegetales mínimamente procesados (frutas y verduras precortadas, ensaladas); salsas, dips, untables y guacamole; y productos pesqueros (ostras, langosta) (Avure, 2012). Algunos productos relevantes se muestran en la Tabla 2.1. Puede observarse que los productos lácteos procesados industrialmente con alta presión son contados. A nivel mundial, se estima que existen más de 150 centros de procesamiento de alimentos a alta presión (Mújica-Paz *et al.*, 2011).

El procesamiento a alta presión (PAP) involucra la exposición de un alimento a presiones elevadas en el rango de 100 a 1000 MPa y es capaz de inactivar microorganismos barosensibles (NACMCF, 2006); el aumento de presión produce un incremento de temperatura por calentamiento adiabático y una disminución reversible de pH (Mújica-Paz *et al.*, 2011). El PAP se considera un tratamiento no térmico debido a que la conservación del producto no depende directamente del

incremento de temperatura asociado; de hecho, con frecuencia se busca minimizar mediante sistemas de enfriamiento apropiados.

TABLA 2.1. Productos comerciales tratados con alta presión (Buffa, 2003; Avure, 2012; NC Hiperbaric, 2012)

PRODUCTO	EMPRESA	PAIS
Leche*	<i>Villa de Patos</i>	México
Bebida de leche + calostro*	<i>Col +</i>	Nueva Zelanda
	<i>Beskyd</i>	República Checa
	<i>CheilJedang</i>	China
	<i>Cold Press</i>	Reino Unido
	<i>Frubaca</i>	Portugal
	<i>Fruityline</i>	Holanda
	<i>K-Sun</i>	Líbano
Jugos de frutas, néctares, smoothies	<i>Invo</i>	España
	<i>Itoham</i>	Japón
	<i>Jumex</i>	México
	<i>Odwalla</i>	EEUU
	<i>Ortogel</i>	Italia
	<i>Pampryl</i>	Francia
	<i>Preshafood</i>	Australia
	<i>Reboot your life</i>	Australia
	<i>Villa de Patos</i>	México
	<i>Abraham</i>	España
Jamón y otros productos cárnicos cocidos (jamón serrano, salami, roastbeef, productos listos para consumirse, deli)	<i>Campofrío</i>	España
	<i>Deli24</i>	Reino Unido
	<i>Espuña</i>	España
	<i>Hormel</i>	EEUU
	<i>Itoham</i>	Japón
	<i>Jamcal</i>	España
	<i>Zwanenberg</i>	Holanda
Aves (pollo precocido, foie gras)	<i>Martiko</i>	España
	<i>Moiras Mac</i>	Australia
	<i>Perdue</i>	EEUU
	<i>Avomex</i>	EEUU
Guacamole	<i>Simplot</i>	EEUU
	<i>Verfruco</i>	México
Margarina	<i>Kaneka Corp</i>	Japón
	<i>Cinque degrés ouest</i>	Francia
Ostras y langosta	<i>Joey Oysters</i>	EEUU
	<i>Motivatit SeaFoods</i>	EEUU
	<i>Nisbet Oysters</i>	EEUU
	<i>Ocean Choice Intl</i>	Canadá

* Productos lácteos

Antecedentes

De acuerdo a Tewari *et al.* (1999), el mecanismo de acción PAP se encuentra sustentado en dos principios básicos: el de LeChatelier-Braun y el isostático. La presión y el volumen son inversamente proporcionales; una gran parte de reacciones bioquímicas en sistemas biológicos resultan en un cambio en el volumen. El principio de LeChatelier establece que cuando a un sistema le es impuesta una limitante, éste reaccionará para intentar minimizar esa limitación. Entonces, si un PAP ejerce una limitante de volumen sobre el producto, se promoverán modificaciones en el alimento que conlleven una disminución de volumen, las cuales pueden incluir cambios en las conformaciones espaciales de macromoléculas, transiciones de fase, cambios en hidratación de polímeros, entre otras (Welti-Chanes *et al.*, 2006). Johnston (1995) lo define en términos cinéticos: las reacciones con volúmenes de activación (ΔV) positivos se retardarán mientras que aquellas con ΔV negativos se acelerarán. En la Tabla 2.2 se presentan los cambios de volumen asociados con la formación de los principales enlaces e interacciones relevantes en sistemas biológicos; de acuerdo al principio de Le Chatelier, los enlaces electrostáticos se verían afectados por el PAP, al igual que las interacciones hidrofóbicas. Mientras tanto, la formación de enlaces covalentes y la hidratación de grupos cargados se vería reforzada (Welti-Chanes *et al.*, 2006); los puentes de hidrógeno pueden formarse y romperse al someterse a un PAP, dependiendo del tipo de sistema biológico analizado y de los rangos de presión aplicados. Pueden existir variaciones en estas tendencias (p.e. la estabilidad de las interacciones hidrofóbicas puede variar dependiendo del grado de hidrofobicidad de la estructura y de la magnitud de presión), pero en términos generales el PAP sólo afecta interacciones más débiles.

Esta diferencia en el efecto del PAP sobre sistemas biológicos tiene implicaciones directas en la conservación de características sensoriales de productos alimenticios. Los enlaces e interacciones que sufren modificaciones están asociados con macromoléculas y no con sustancias de bajo peso molecular (péptidos, ciertos lípidos, volátiles, vitaminas, formados por enlaces covalentes y mínimamente compresibles). En consecuencia, un producto PAP puede poseer características de sabor y olor similares a las de un producto fresco, al contrario de lo que ocurre con los productos tratados térmicamente (que afectan enlaces

covalentes); por otra parte, las alteraciones en los enlaces no covalentes pueden afectar la textura y la funcionalidad de las macromoléculas; esto a su vez, puede resultar características sensoriales y funcionalidades deseables o indeseables.

TABLA 2.2. Cambio de volumen asociado con formación de enlaces e interacciones moleculares (De Lamo-Castellvi, 2006)

Tipo de enlace/ interacción	Cambio de volumen (ml/mol)
Formación de enlaces covalentes	-10
Hidratación de un grupo cargado	-10
Puentes de hidrógeno	~0
Formación de enlace electrostático	10-20
Interacciones hidrofóbicas	10-20

Cuando un producto preempacado se sumerge en un líquido al cual se le aplica alta presión, esta se transmite en todas direcciones uniforme e instantáneamente; esto permite minimizar el daño físico en productos sólidos y hace que el efecto de conservación sea independiente de la forma y tamaño del alimento; esto constituye el principio isostático y facilita los cálculos para el escalamiento de procesos (Jung *et al.*, 2011).

2.2.2 Clasificación de procesos a alta presión.

Dependiendo del mecanismo empleado para incrementar la presión, los PAPs pueden clasificarse como estáticos y dinámicos. Las características más relevantes de cada sistema se describen a continuación.

2.2.2.1 Procesos de alta presión hidrostática

Gran parte de la investigación desarrollada en el PAP de productos alimenticios se ha realizado con equipos que operan con agua como agente indirecto de transmisión, por lo que se le denomina PAP *hidrostática* (PAPH). Este

Antecedentes

sistema, de naturaleza discontinua, por lo regular consta de un recipiente presurizado con tapa (cámara) que contiene productos preempacados, un sistema de presurización, un dispositivo de control de temperatura y aditamentos para manejar el producto (San Martín-González *et al.*, 2006). La aplicación de presión puede realizarse también de manera directa a través de un pistón que reduzca el espacio interior de la cámara de tratamiento que contiene el producto, aunque únicamente es útil para alimentos fluidos. El esquema de un equipo de compresión indirecta, el más común en el ámbito industrial, se muestra en la Figura 1. Un producto previamente empacado se coloca dentro de una cámara donde se inyecta el medio de presurización mediante un intensificador (o bomba de alta presión) hasta que la presión de operación de proceso se alcanza. Dependiendo del tipo de producto, del microorganismo más baroresistente y/o de las características sensoriales, fisicoquímicas o tecnológicas deseables en el producto terminado, el producto es retenido en la cámara durante un tiempo de proceso predeterminado (de unos minutos a una hora, aproximadamente). Esta forma de operación representa una ventaja competitiva sobre los tratamientos térmicos, pues una vez alcanzada la presión de operación no existen pérdidas de energía ni requerimientos energéticos adicionales, lo cual es conveniente desde el punto de vista económico.

Otras variables relevantes del PAPH incluyen: tiempo para alcanzar la presión de operación (*come-up time*), tiempo de despresurización, T_i y temperatura de proceso. La temperatura debe controlarse mediante sistemas de enfriamiento pues se observa un incremento de temperatura en el orden de 3-9°C por cada 100 MPa, dependiente del tipo de equipo, producto presurizado, T_i y presión de operación. Existe un efecto antagónico entre la compresión, que genera una disminución de volumen, y el incremento de temperatura que ocasiona un aumento de volumen.

El incremento de temperatura se atribuye a procesos de fricción interna y puede calcularse mediante la Ecuación 1.

$$\frac{dT}{dP} = \frac{\beta T}{\rho C_p} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde β , ρ y C_p representan la expansividad térmica, la densidad y el calor específico de un fluido comprimido (Chawla *et al.*, 2011)

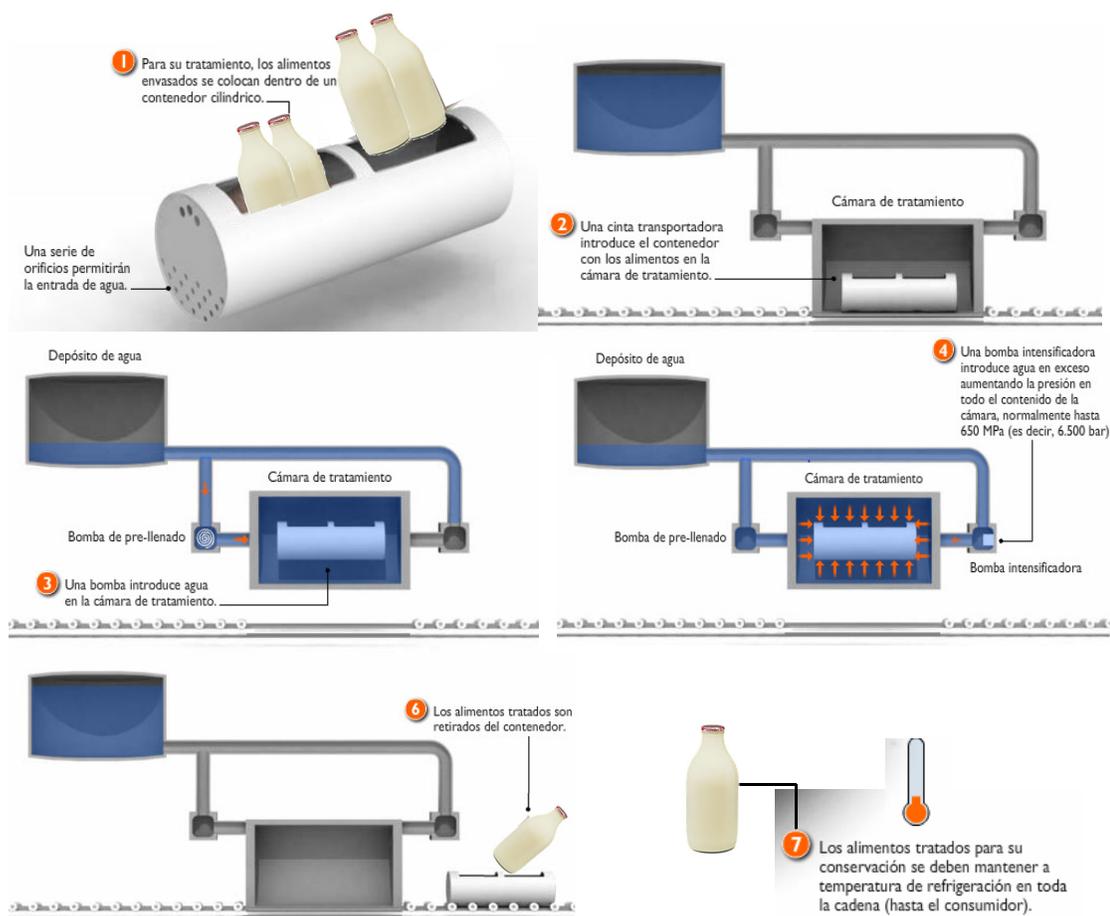


FIGURA 2.1. Funcionamiento de un equipo de PAPH por compresión indirecta (Adaptado de Azti Tecnalia, 2011)

Los efectos del PAPH en alimentos incluyen cambios en actividad enzimática, inactivación microbiana, modificación de las propiedades de macromoléculas, como proteínas y carbohidratos principalmente (Raventos-Santamaría, 2005). El tipo de cambios observados, relacionados con rangos específicos de presión se muestran en la Tabla 2.3; esta tabla debe emplearse como una guía básica pues, en realidad, los efectos del PAPH sobre los alimentos dependen fuertemente del sistema estudiado y pueden variar drásticamente. Factores intrínsecos al alimento como pH, composición, carga microbiana inicial, actividad de agua, presencia de antimicrobianos, entre otras afectarán el desempeño del PAPH y sus efectos sobre el producto procesado.

TABLA 2.3. Principales efectos del PAPH sobre los alimentos

Presión (MPa)	Efectos en los alimentos
>200	Cambios en la cinética enzimática Modificación de propiedades físicas de proteínas Alteración de membrana microbiana
>300	Inactivación enzimática reversible Muerte microbiana
>400	Gelificación de almidón Desnaturalización proteica
>500	Muerte de esporas bacterianas Inactivación enzimática

Mussa y Ramaswamy (1997) definieron parámetros cinéticos para la inactivación microbiana por PAPH (200-400 MPa, 5-120 min), asumiendo un comportamiento de cinética de primer orden (Ec. 2)

$$\text{Log} \frac{N_0}{N} = -kt \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

N=número de microorganismos sobrevivientes tras un tratamiento PAPH durante el tiempo por t (min); N_0 = número inicial de microorganismos; k = constante de la velocidad de reacción (min^{-1}).

Empleando la Ec. 2, se despejaron valores D (tiempos de reducción decimal, análogos en significado a estudios termobacteriológicos, donde $D=2.303/k$), conociendo las cuentas microbianas inicial y final tras un PAPH a una presión de operación P por tiempo predefinido. Asimismo, se calculó un valor de barorresistencia Z_p , definido como el rango de presión entre el cual el tiempo de reducción decimal D disminuía en un 90% y calculado como el recíproco negativo

de la pendiente de la gráfica $\log D$ vs P . Finalmente, el cambio de volumen de activación (ΔV^\ddagger) se calculó mediante la relación:

$$\Delta V = -RT \left(\frac{\delta \ln K}{\delta P} \right)_T \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde

P =presión; T = temperatura absoluta; R = constante de los gases.

Al comparar los parámetros ΔV^\ddagger y Z_p para poblaciones microbianas con aquellos calculados para indicadores de tratamiento térmico (fosfatasa alcalina) y factores de calidad de leche (viscosidad y color) (Tabla 4) se observó una mayor sensibilidad microbiana al incremento de presión, reflejado en valores ΔV^\ddagger de mayor magnitud negativa (más probables de ocurrir, de acuerdo al principio de LeChatelier) y Z_p menores (un menor incremento de presión es requerido para disminuir D en un ciclo \log_{10}). Estos resultados refuerzan la idea del PAPH como un tratamiento de conservación que minimiza la alteración de las características sensoriales de los alimentos.

TABLA 2.4. ΔV^\ddagger y Z_p de microorganismos, fosfatasa alcalina, viscosidad y color de leche sometida a presurización

Atributo	Z_p (MPa)	ΔV^\ddagger (10^{-5} m ³ /mol)
Microorganismos	168	-3.35
Fosfatasa alcalina	398	-1.41
Viscosidad	404	-1.39
Color	532	-1.05

2.2.2.2 Procesos de alta presión dinámica

Una de las principales limitantes del PAPH es su naturaleza discontinua. Por ello, en años recientes se ha implementado un proceso continuo exclusivo para productos fluidos, que se conoce como tratamiento a alta presión dinámica u

homogeneización a alta presión (HAP). Partiendo de la misma premisa de funcionamiento de un homogenizador convencional, pero trabajando a presiones considerablemente mayores (100-400 MPa), la HAP comparte muchas características similares a las del PAPH, pero el mecanismo de acción es completamente diferente. La HAP constituye una de las alternativas más novedosas para el procesamiento no térmico de productos fluidos.

La homogeneización convencional es uno de los procesos estándar en la industria láctea. Su objetivo fundamental es reducir el tamaño del glóbulo graso, (0.1 - 15 μm de diámetro, promedio de 3-5 μm) para retardar la separación de la crema del suero, fenómeno conocido como cremado (Fox y McSweeney, 1998). La homogeneización modifica esta distribución de tamaño, produciendo una mayoría de glóbulos con diámetro menor a 2 μm (Huppertz y Kelly, 2006), lo cual reduce la tendencia a los glóbulos a coalescer y en consecuencia, la tasa de cremado, aumentando su estabilidad fisicoquímica. Esta reducción en la velocidad de cremado se deduce de la ley de Stokes, la cual puede escribirse como:

$$V_c = 2r^2 (\rho_s - \rho_g) \left(\frac{g}{9\eta}\right) \quad (\text{Ec. 4})$$

donde:

V_c = Velocidad de cremado (velocidad terminal o de separación de fases)

r : radio promedio del glóbulo graso

ρ_s : densidad del suero (fase continua)

ρ_g : densidad de la grasa (fase dispersa)

g : aceleración por gravedad

η : viscosidad de fase dispersa

La ley de Stokes se aplica para objetos esféricos (como los glóbulos) moviéndose dentro de fluidos laminares (como el suero de leche), experimentando fricción (Lewis, 1993). La homogeneización afecta directamente la magnitud del radio promedio del glóbulo graso y, por tanto, posibilita la disminución de la velocidad de cremado de manera significativa.

La homogeneización es un proceso que se produce por medios mecánicos a través de mezcladores de alta velocidad, molinos coloidales, microfluidizadores,

homogenizadores ultrasónicos y de presión (HP) Estos últimos son los más empleados en industria láctea. Un HP consiste de una bomba de presión (de 10-70 MPa) acoplada a una válvula de homogeneización (Fellows, 2000). La bomba permite incrementar la presión del fluido de 0.3 a 10-25 MPa, dependiendo del producto. El esquema de la válvula de homogeneización de un HP se presenta en la Figura 2.2; la válvula está constituida por 2 partes principales: asiento y cabezal; un anillo de impacto se coloca usualmente a la salida de la primera etapa. Dependiendo de la presión a aplicar, el espacio entre el cabezal y el asiento de la válvula se puede regular a través de la fuerza que se le aplique al cabezal; este espacio puede reducirse hasta cerca de 30 μ m. Por otra parte, el anillo de impacto está unido al asiento de tal manera que la superficie interna es perpendicular a la salida de este espacio. El asiento siempre mantiene un ángulo de 5° en relación al cabezal para controlar la aceleración del fluido (Bylund, 2003). Cuando se bombea líquido a través del espacio ajustable, éste incrementa su velocidad (hasta alcanzar 80-400 m/s) en unos cuantos microsegundos y de inmediato la reduce al emerger del espacio (Fellows, 2000). Estas condiciones de operación definen las fuerzas que reducen el tamaño del glóbulo graso. El flujo a través de un espacio diminuto genera condiciones de alta *turbulencia* y *cizalla*; el líquido tiende a formar pequeños remolinos que, si impactan contra glóbulos de tamaño similar, causan su rompimiento. Otro fenómeno involucrado es la *cavitación*, caracterizada por el colapsamiento de burbujas de aire ocluidas en el fluido o, más frecuentemente, formadas por ebullición localizada del fluido durante el proceso de homogeneización; el paso del flujo a través del espacio ajustable provoca una caída de presión estática por el incremento súbito de velocidad ya descrito; si la presión estática disminuye por debajo de la presión de vapor del fluido, el líquido pasa a fase gaseosa en zonas localizadas, donde se forman burbujas; sin embargo, al salir de la válvula, el fluido disminuye su velocidad nuevamente, la presión estática vuelve a subir y las burbujas implosionan. La fuerza de la implosión genera ondas de choque que ayudan a reducir el tamaño del glóbulo; también existe una contribución importante de las *fuerzas de impacto* de los glóbulos contra un anillo ubicado generalmente a la salida del espacio entre el asiento y el cabezal, cuya magnitud depende de la velocidad del fluido (Bylund, 2003).

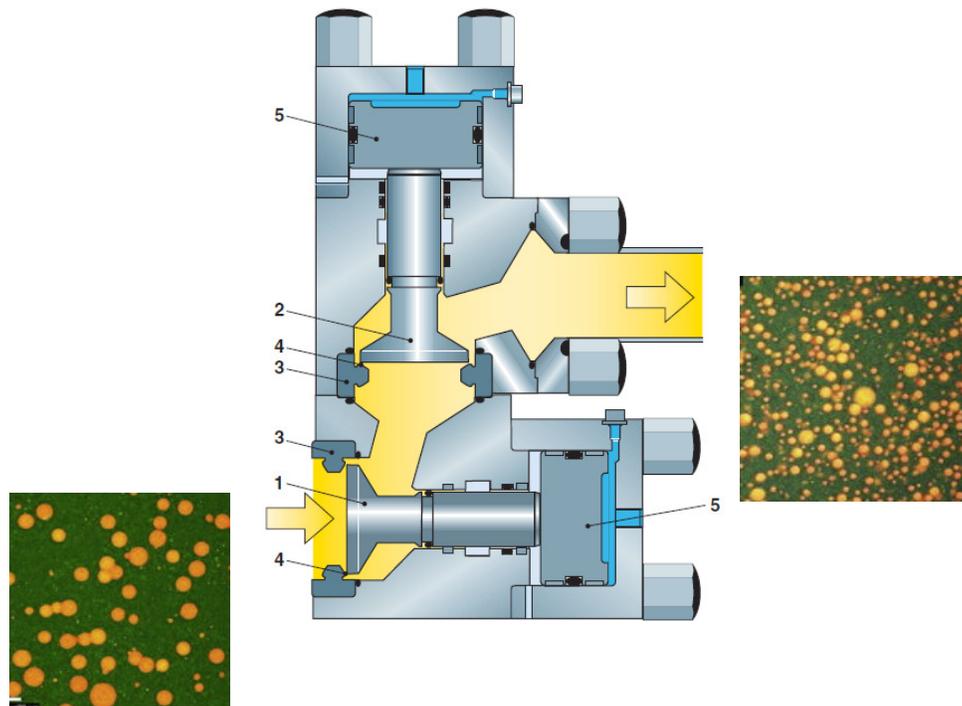


Figura 2.2. Estructura de válvulas de homogeneización y cambio en el tamaño y la distribución de partícula de glóbulos de grasa de leche bovina (Adaptado de Bylund, 2003; Berton *et al.*, 2012) 1. Cabezal de primera etapa; 2. Cabezal de segunda etapa; 3. Asiento de la válvula; 4. Espacio. 5. Sistema hidráulico

De acuerdo a Goff (2013), las variables asociadas con el proceso de homogeneización están relacionadas con factores de diseño y operación del equipo (tipo de válvula, presión de operación, número de etapas) y con el tipo de muestra (contenido de grasa, tipo y contenido de emulgente, viscosidad, temperatura y tamaño promedio del glóbulo de grasa inicial). La presión de proceso determina la velocidad máxima que alcanza el fluido en la válvula y en consecuencia, la caída de presión y la magnitud de la disminución del tamaño del glóbulo. En la industria láctea, la homogeneización de leche es por lo regular un proceso de dos etapas (ver Figura 2.2); la crema se separa centrífugamente, se homogeneiza a presiones de 10-20 MPa y se mezcla nuevamente con leche descremada para estandarizarla a un porcentaje de grasa deseado. En términos generales, la mayor parte de la

reducción de tamaño se lleva a cabo en la primera etapa de homogeneización, pero la segunda, que opera a presiones sensiblemente menores (10-20% de la presión de la primera etapa) es necesaria para inhibir la aglomeración y eventual coalescencia de los nuevos glóbulos formados (Walstra *et al.*, 2006). La composición de la leche es de vital importancia; un mayor contenido de grasa dificulta la homogeneización, pues la formación de aglomerados es más probable; por otra parte, la membrana nativa de los glóbulos resulta insuficiente para cubrir el gran incremento (4-6 veces) en el área superficial de la interfase grasa/suero (Goff y Hill, 1993). Así, la nueva membrana se conforma por secciones de la membrana nativa, proteínas absorbidas del suero, fragmentos de caseína e inclusive micelas de caseína completas (Figura 2.3); si la razón grasa/proteína es demasiado baja, no habrá suficiente material para conformar las nuevas membranas. En relación a la temperatura del producto, si es demasiado baja, la grasa estará solidificada y la homogeneización no será tan efectiva; a temperaturas en el rango de 30 a 35°C la fase lipídica está parcialmente solidificada, por lo que la homogeneización se lleva a cabo generalmente a temperaturas superiores a 40°C; la homogeneización también provoca cierto incremento de temperatura; por cada 4 MPa de caída de presión en la válvula, la temperatura de la leche se incrementa en 1°C. La temperatura no sólo influye en la magnitud de la disminución promedio de tamaño del glóbulo, sino su dispersión (Bylund, 2003).

La distribución de tamaños de glóbulos de grasa cambia también por efecto de la homogeneización y se determina por difracción láser (Huppertz *et al.*, 2003). Curvas típicas de dispersión de tamaño de glóbulos grasos de leche en leche cruda y homogeneizada a P=10, 25 MPa se presenta en la Figura 2.4. Como se observa, la distribución de tamaño se hace menos dispersa y el tamaño promedio se desplaza hacia diámetros <5 µm conforme aumenta la presión de proceso.

La homogeneización se aplica comercialmente desde inicios del siglo XX. Aunque el diseño de los homogeneizadores ha evolucionado de manera importante desde entonces, los avances más significativos en los últimos veinte años se han centrado en modificaciones de la válvula tanto en materiales de fabricación como en parámetros geométricos y de flujo (Thiebaud *et al.*, 2003; Fluory *et al.*, 2000).

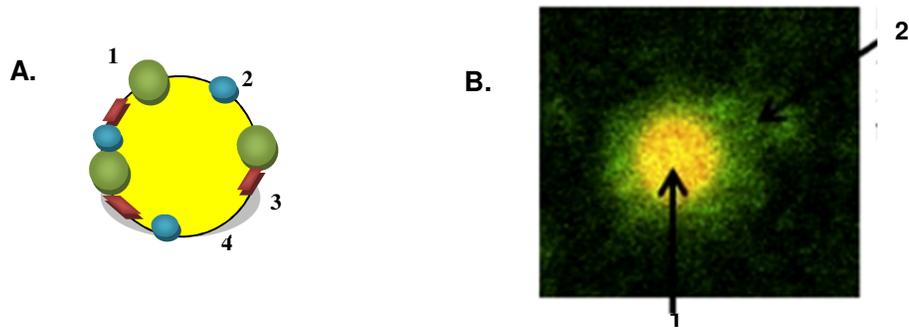


FIGURA 2.3. Glóbulo de grasa de leche bovina sometida a homogeneización **A.** Cambios en la membrana 1. Micela de caseína; 2. Fragmento de micela; 3. Proteína de suero; 4. Membrana nativa de glóbulo de grasa. **B.** Micrografía obtenida por microscopía confocal láser de barrido 1. Triacilglicérols; 2. Proteínas lácteas adsorbidas en la superficie (Adaptado de Berton *et al.*, 2012)

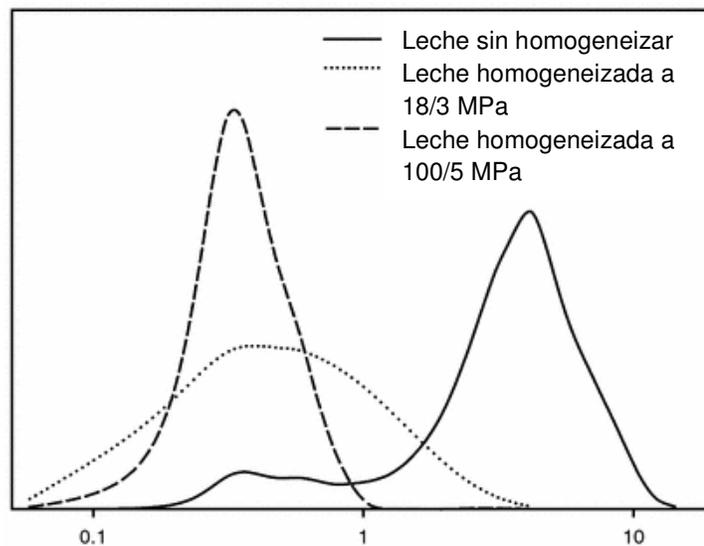


FIGURA 2.4 Distribución de tamaño de glóbulo de grasa en leche cruda y homogeneizada (Huppertz y Kelly, 2006)

Dentro de los materiales novedosos empleados en la fabricación de cabezales, asientos y boquillas se utilizan cerámica resistente a la abrasión como carburo de zirconio o de tungsteno (ver Figura 2.5) o piedras preciosas como rubí, diamante o zafiro. Los diseños de válvula más comúnmente empleados se presentan en la Figura 2.6; en el esquema de aguja y asiento, la presión se controla

Antecedentes

con la reducción del espacio entre ambos, a través de una fuerza ejercida sobre la aguja, misma que bloquea parcialmente el flujo del fluido. La conformación de esta válvula difiere de los equipos de baja presión donde el líquido a presurizarse se alimenta de manera axial en el asiento de la válvula y el líquido acelera en el espacio ajustable entre el cabezal y el asiento (ver Fig. 2.2); mientras tanto, en este tipo de válvula el líquido se alimenta por el cabezal y recorre el espacio a lo largo del mismo, antes de acelerar por el espacio ajustable antes mencionado. Los fenómenos de flujo que ocurren con este diseño de válvula son complejos y difieren de los estudiados en válvulas de baja presión (Fluory *et al.*, 2004). Mientras tanto, en las válvulas tipo boquilla la presión se controla mediante la potencia de la bomba que desplaza al líquido hacia la válvula y el diámetro del orificio (generalmente menor a 0.35mm) (Harte, 2012). Con el microfluidizador, una corriente de líquido se separa en dos microcorrientes que posteriormente se recombinan por colisión, lo cual permite incrementar la presión hasta ~300 MPa (Feijoo *et al.*, 1997).



FIGURA 2.5 Materiales de válvulas de homogeneización. **A.** Boquilla de diamante y aguja de cerámica. **B.** Asientos de acero inoxidable (Harte, 2012)

Los cambios descritos en el diseño de la válvula de homogeneización han permitido producir una distribución comparable de tamaño de glóbulos grasos a presiones de operación considerablemente más bajas que las que se requerirían con válvulas de homogeneización estándar (Goff y Griffiths, 2006); sin embargo, la modificación más notable es la posibilidad de incrementar la presión máxima de operación en tal magnitud que, actualmente, homogenizadores de escalas industrial, piloto y de laboratorio son capaces de trabajar a rangos muy por encima del mínimo requerido para ser considerado como un PAP (100 MPa). Estos

equipos, conocidos como homogenizadores a alta presión pueden generar cambios en productos alimenticios fluidos que son equiparables a los del PAPH pero, debido a que pueden aplicar la presión dinámicamente bajo condiciones de flujo continuo, pueden integrarse con mayor facilidad a procesos industriales. Un homogeneizador de alta presión opera de manera similar a uno convencional; consiste de un generador de alta presión, acoplado a una válvula fabricada con materiales de alta resistencia acordes con la intensidad del proceso, a través de la cual se hace pasar un fluido a presurizar.

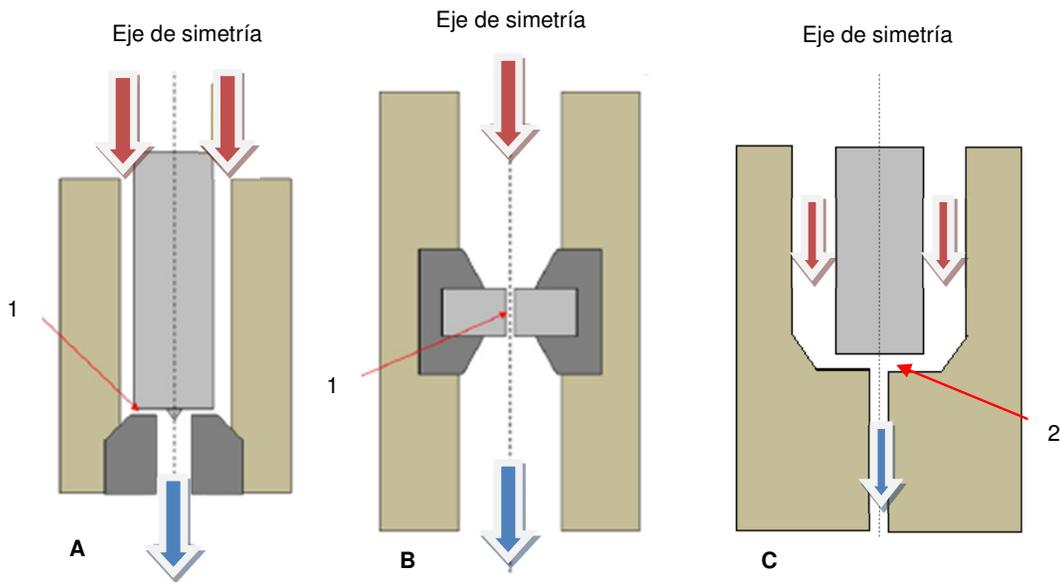


FIGURA 2.6 Diseño geométrico y flujo en válvulas de homogeneización

A. Asiento y aguja. **B.** Válvula tipo boquilla. **C.** Microfluidizador 1. Espacio ajustable; 2. Zona de colisión. (Donsi *et al.*, 2013; Dumay *et al.*, 2013; Harte, 2012)

Los mismos fenómenos que propician la reducción de tamaño de partícula en homogenizadores convencionales (turbulencia, cizalla, cavitación, impacto) se presentan, aunque a intensidades considerablemente mayores, y producen emulsiones muy finas y estables, con menor polidispersión de tamaño y diámetros $<0.3-0.4\mu\text{m}$; inducen inactivación microbiana y enzimática aún a temperaturas moderadas de operación (40-50°C); modificación de las propiedades reológicas y funcionales de fluidos como la leche bovina, modificando a su vez las propiedades de productos elaborados con ésta (Pinho *et al.*, 2011a; Briñez, 2006; Popper y

Knorr, 1990), como se describirá en detalle más adelante. Hoy en día los homogenizadores a alta presión se emplean en las industrias farmacéutica, cosmética, biotecnológica y alimenticia en aplicaciones diversas, incluyendo ruptura celular (para liberación de contenidos celulares), formación de microemulsiones y nanopartículas, estabilización de suspensiones e inactivación microbiana para conservación alimenticia (Semo *et al.*, 2007; Diels, 2006; Fluory *et al.*, 2000; Paquin, 1999). Los equipos comerciales más importantes se muestran en la Tabla 2.5.

TABLA 2.5. Homogeneizadores de alta presión disponibles comercialmente

Equipo	Fabricante	Tipo	Presión límite (MPa)	Flujo (L/h)
<i>Nanojet®</i>	Haskel Intl.	Microfluidizador	200	30
<i>Emulsiflex®</i>	Avestin Inc.	Boquilla	207	15-1000
<i>Soavi®</i>	Niro	Asiento y aguja	150	10- 3000
<i>Debee®</i>	Bee Intl.	Boquilla	310	3- 5750
<i>Stansted®</i>	SFP	Asiento y aguja	410	16-240

Los homogenizadores de alta presión más frecuentemente reportados en la bibliografía son los fabricados por *Stansted Fluid Power (SFP)*, compañía inglesa que comercializa equipos de escala de laboratorio, piloto y para producción industrial, y a la fecha, alcanzan los límites de presión más altos (ver Tabla 2.5). Una representación esquemática básica de la sección de alta presión de un homogenizador *Stansted FPG7400H:350*, similar al empleado en este trabajo, se presenta en la Figura 2.7 (Chevalier-Lucía *et al.*, 2011). Este equipo opera a presiones de hasta 350 MPa y funciona con dos intensificadores de 80 mL de capacidad útil (1), impulsados por una bomba hidráulica (2); el ciclo de operación se lleva a cabo en dos etapas: llenado del primer intensificador (aprox. 9 s) y aumento de presión y descarga del intensificador (10 s); la velocidad de flujo depende de la presión de operación y va de 13.6 L/h a 300 MPa hasta 16 L/h a 100 MPa. El ciclo se repite con cada intensificador, existiendo cierto tiempo predefinido de traslape, establecido para mantener estable el nivel de presión de

homogeneización y estimado como 1/100 de la presión, en MPa (Freeman, 2007). Durante su estancia en el intensificador, el líquido se ve sometido a alta presión hidrostática (Dumay *et al.*, 2013). El líquido presurizado pasa entonces a la válvula de alta presión (3), para ser inmediatamente enfriado mediante una chaqueta por la que pasa un fluido criogénico a 4°C. Esto es necesario, pues la intensidad a la que se presentan las fuerzas de homogeneización ocasiona la elevación adiabática de la temperatura del fluido; en leche, se ha determinado que este incremento varía con la presión de operación y la T_i ; por ejemplo, Datta *et al.* (2005) estimaron que este incremento correspondía a $0.5887^\circ\text{C} / ^\circ\text{C}$ de T entrada. Por su parte, Fluory *et al.* (2000) observaron un aumento de 46°C en la T de emulsiones modelo aceite en agua (O/W) al incrementar el nivel de presión de 20 a 300 MPa y atribuyeron este calentamiento a estrés viscoso por la alta velocidad de flujo. Finalmente, una segunda homogeneización (4) cumple la misma función descrita con los homogenizadores de baja presión y trabaja de 1/3 a 1/10 de la magnitud de presión de la primera etapa, sin exceder 40 MPa (Serra *et al.*, 2007).

2.3 Efectos del procesamiento a alta presión en leche

A pesar que leche bovina fue el primer producto sometido a PAP, los cambios generados por efecto de este proceso no han sido completamente estudiados y comprendidos, en parte por su misma complejidad fisicoquímica nativa y por que se considera que estas modificaciones son las más extensas de entre los productos estudiados hoy en día. Aspectos científico-tecnológicos asociados al PAP que no han sido elucidados y que limitan la posibilidad de diseñar procesos eficientes de alta presión incluyen información insuficiente sobre efectos sinérgicos con otros factores de conservación, identificación plena y avalada por legislación de patógenos más barorresistentes (y sucedáneos), pruebas insuficientes sobre posible daño subletal, carencia de modelos cinéticos, factores críticos de proceso e indicadores, entre otros (IFT, 2002). Esto, aunado al costo del equipo (0.7-3.5 millones de dólares por un equipo con presión de operación máxima de 600 MPa) y a un bajo volumen de producción (especialmente con equipos hidrostáticos) han limitado las aplicaciones industriales del PAP a nichos de mercado donde presenta

una ventaja competitiva sobre procesos tradicionales (San Martín-González *et al.*, 2007; Huppertz *et al.*, 2006; Torres y Velázquez, 2005).

Se ha reportado que el PAP tiene efectos en diversos factores de conservación, funcionalidad y aceptabilidad sensorial de leche, incluyendo reducción de carga microbiana (y sus cambios durante el almacenamiento refrigerado) inactivación enzimática, cambios en componentes lácteos (caseínas, proteínas séricas, glóbulos grasos, balance mineral, volátiles), propiedades de coagulación enzimática y ácida, color, entre otros (Trujillo *et al.*, 202; Geciova *et al.*, 2002). Los principales cambios fisicoquímicos y microbiológicos reportados en leche se analizan en secciones posteriores.

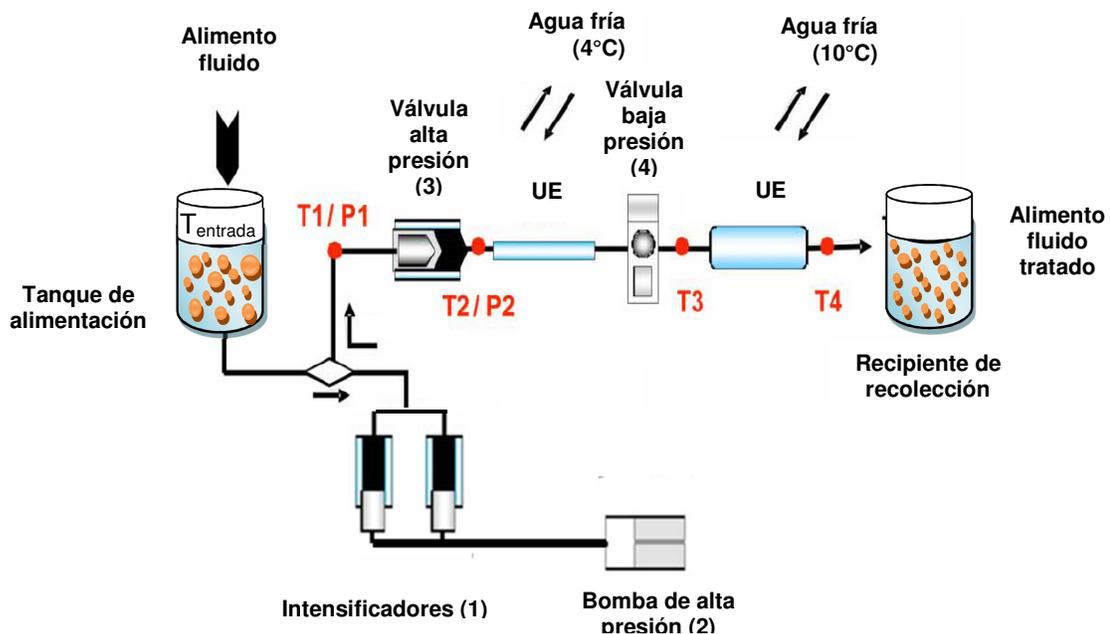


FIGURA 2.7. Esquema de funcionamiento de homogeneizador *Stansted* con dos intensificadores. UE: Unidad de intercambio de calor. T1/P1: Sensor de temperatura y presión del fluido antes de la válvula de alta presión. T2/P2: Sensor a la salida de la válvula de alta presión. T3: Sensor de T a la salida de la válvula de baja presión. T4: Sensor después del segundo enfriamiento del fluido.

2.3.1 Inactivación microbiana

El estudio de la PAP en leche se fundamenta en su exploración como una alternativa de conservación para crear productos inocuos desde el punto de vista

microbiológico. Por tanto, el potencial del PAP sobre la reducción en la población microbiana nativa y contaminante habitual de leche ha sido vastamente explorado. Aunque se han propuesto posibles mecanismos de inactivación microbiana por PAP a la fecha no se ha logrado entender por completo este fenómeno. Dentro de estos mecanismos, que se piensa ocurren simultáneamente e interactúan entre sí, se incluyen lesiones en la membrana citoplásmica, modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular que alteran los mecanismos de entrada de nutrientes y salida de desechos, cambios en la morfología microbiana, en enzimas clave y en mecanismos genéticos de los microorganismos, desnaturalización proteica, etc. (Diels y Michiels, 2006; Patterson, 2005). Los factores de barorresistencia microbiana pueden clasificarse en tres grupos: asociados con parámetros de proceso, relacionados con el tipo de producto alimenticio (pH, a_w , presencia de calcio, viscosidad para HAP) y dependientes de las características y estado fisiológico del microorganismo (Diels y Michiels, 2006; Vachon *et al.*, 2002).

2.3.1.1 Factores microbianos

Las células vegetativas se dañan comúnmente en un intervalo de presión hidrostática de 50 a 400 MPa (Guerrero-Beltrán, 2005) dependiendo de la temperatura de proceso y el tipo de matriz alimenticia tratada; por otra parte, el potencial antimicrobiano de HAP empieza a ser evidente a partir de 150 MPa, aunque la mayor parte de los reportes emplean presiones superiores a 200 MPa. La fortaleza de la pared celular determina en buena medida la barorresistencia de un microorganismo, dado que el PAP se basa en su inactivación por medios mecánicos. De manera análoga a como ocurre con los procesos térmicos, las células en fase exponencial de crecimiento, las Gram- y las vegetativas son menos resistentes al PAP que las células en fase estacionaria, las Gram+ y las esporas. (Diels *et al.*, 2003; Gervilla *et al.*, 2001; Kelemen y Sharpe, 1979). Estas diferencias pueden explicarse en términos de la proporción de peptidoglucano, un copolímero de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico de cadena lineal y con capacidad de entrecruzamiento a través de enlaces peptídicos, que constituye la estructura básica de la pared celular de las bacterias. Los microorganismos Gram+ poseen

Antecedentes

paredes celulares rígidas con una capa de peptidoglucano de 20-80 nm de ancho, la cual constituye hasta el 90% de su peso en base seca; mientras tanto, las bacterias Gram- poseen paredes mucho más delgadas (7-8nm) y son más sensibles a los factores físicos de conservación asociados al HAP (cavitación, turbulencia, etc) y al PAPH (compresión). Bajo las mismas condiciones de temperatura de proceso y tiempo de retención (25°C, 10 min) las bacterias Gram+ requieren una presión hidrostática de operación de 500-650 MPa para inactivarse, mientras que las Gram- se eliminan a 300-400 MPa (Trujillo *et al.*, 2002). Sin embargo, también se ha observado una variación importante en la barorresistencia de cepas de la misma especie, por lo que las reducciones reportadas en diferentes trabajos pueden variar drásticamente. Por ejemplo, Chen *et al.* (2006) inocularon ocho patógenos alimentarios en leche ultrapasteurizada y observaron su respuesta a PAP de 0.1 a 690 MPa a 21.5°C, 10 min, sin encontrar una tendencia clara de barorresistencia relacionada a su grupo taxonómico; de hecho, *Shigella flexneri* (una bacteria Gram -) resultó la más resistente. En estudio realizado en sistemas modelo a 200-400 MPa, por 15 min a 25°C, con cinco bacterias gram+ y seis gram, Wuytack *et al.* (2002) realizaron un estudio comparativo entre PAPH y HAP en términos de la barorresistencia de bacterias Gram+ y Gram- y la posible presencia de daños sub-letales producidos por HAP. Suspensiones bacterianas de cinco bacterias Gram+ (*Lactobacillus plantarum*, *L. innocua*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc dextranicum*) y cinco Gram- (*P. fluorescens*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Shigella flexneri*, *E. coli* MG1655, *E. coli* LMM1010, *Y. enterocolitica*) con concentración 8 log fueron presurizada a 25°C por HAP a 100-300 MPa y PAPH a 200-400 MPa (Emulsiflex C5, *Avestin*) y enfriadas inmediatamente con un intercambiador de calor. La barorresistencia de todas las bacterias Gram+ a la HAP fue mayor que la exhibida por cualquiera de las bacterias Gram-, fenómeno no observado con el PAPH, pues, aunque dos microorganismos Gram+ (*E. faecalis* y *S. aureus*) fueron los más barorresistentes y dos Gram- los más sensibles (*P. fluorescens* y *Y. enterocolitica*), el resto de los microorganismos se traslapaban en el orden de resistencia. Esto mostró que hay diferencias entre los mecanismos de inactivación asociados a cada proceso, al menos en los rangos de presión estudiados. Para el caso de HAP, todas las bacterias Gram+ exhibían menos de 1 reducción log hasta P=300 MPa, con excepción de *P. fluorescens*

Antecedentes

(aprox. 1.5). *S. aureus* y *E. faecalis* fueron las bacterias más resistentes. Mientras tanto, reducciones log 2 a 4.6 a P=200 MPa y 4.5-6.5 a P=300 MPa se observaron para las bacterias Gram-. Dentro de este grupo, la bacteria mas resistente fue *Y. enterocolitica*. Por otra parte, la HAP demostró no provocar daño subletal en los microorganismos más resistentes de cada grupo. Las suspensiones celulares sin tratar y presurizadas fueron diluidas serialmente y sembradas en agar de cuenta estándar modificado con factores selectivos, incluyendo bajo pH y NaCl, sin presentarse cambios en las cuentas para pH en el rango de 5.5-7 y NaCl al 1-2% de concentración; esto limita las aplicaciones del HAP como un factor de conservación dentro del contexto de tecnología de obstáculos.

Comparativamente, la inactivación de hongos y levaduras por HAP se presenta por lo regular a presiones menores; Rastogi *et al.* (2007) reportaron que presión hidrostática en el rango de 300 a 600 MPa resultaba efectiva para eliminarlos, aunque algunas especies de géneros selectos como *Byssochlamys*, *Neosartorya* y *Talaromyces* se consideran altamente barorresistentes. Por otra parte, las esporas pueden resistir hasta 1000 MPa de presión hidrostática (Mújica-Paz *et al.*, 2011), magnitud que excede considerablemente el nivel operativo de los equipos comerciales (600 MPa) pero tratamientos de baja intensidad (50-300 MPa) seguidos de la aplicación de presiones moderadas (300-500 MPa) permiten su germinación y eliminación posterior (Considine *et al.*, 2008). La resistencia de esporas a HAP ha sido explorada por autores selectos; Feijoo *et al.* (1997) lograron eliminar 48-68% de esporas de *Bacillus licheniformis* empleando un microfluidizador en una mezcla para helado procesada a P=200 MPa con T iniciales de 33 y 50°C, respectivamente; la contribución térmica en este proceso fue importante, dado que la temperatura de salida (Ts) de la mezcla fue de 88°C. Pereda *et al.* (2007) reportan reducciones de 30 a 65% de esporas nativas de leche con tratamientos de HAP de 200 y 300 MPa a 40°C; Pinho *et al.* (2011a) estimaron que la reducción de esporas de *Clostridium sporogenes* y *B. stearothermophilus* en leche descremada era nula a 300 MPa con y sin un choque térmico previo (100°C/15 min) para germinarlas y de apenas 0.67 ciclos log en hasta 16 pases consecutivos a la misma presión de operación. Estos resultados dejan clara la imposibilidad de emplear HAP como una herramienta única de conservación para

productos esterilizados comercialmente. En cuanto a virus relevantes en leche, Moroni *et al.* (2002) investigaron sobre las condiciones de inactivación de bacteriófagos mediante HAP (100-200 MPa, 25°C, 1-5 pases) obteniendo hasta 3 reducciones de ciclos log a las condiciones más extremas de las probadas.

La fase de crecimiento celular también juega un papel importante en la sensibilidad que exhiba el microorganismo a la PAP (Geciova *et al.*, 2002). Esto, sin embargo, puede igualmente explicarse en términos de la composición de la pared celular. La red de peptidoglucano es más rígida si está más entrecruzada; dado que las células en fase estacionaria poseen redes más gruesas y con mayor grado de entrecruzamiento que aquellas en fase de crecimiento exponencial, serán menos susceptibles a romperse. Por otra parte, aunque estudios en sistemas modelo reportan a la concentración celular inicial como otro factor de consideración, esto no parece ser el caso en leche. Vachon *et al.* (2002) no encontraron variación en la efectividad de HAP a 250 MPa/25°C para inactivar microorganismos a concentraciones celulares en el rango 10^4 - 10^9 UFC/ml.

2.3.1.2 Tipo de matriz alimenticia

Otro posible factor de variación en el grado de inactivación microbiana es el tipo de matriz alimenticia; se ha probado que la letalidad microbiana disminuye sensiblemente en función del tipo de sustrato y de la composición del producto presurizado. Componentes alimenticios, particularmente polímeros (proteínas, carbohidratos) y lípidos brindan un efecto baroprotector a diversos microorganismos patógenos y deteriorativos. Como resultado, las pruebas de reto microbiano realizadas con sistemas buffer siempre generan mayores grados de inactivación cuando se comparan con las obtenidas en sistemas reales bajo las mismas condiciones de proceso (Smelt, 1998). En el caso concreto de leche, el contenido de grasa parece no afectar el grado de inactivación microbiana (Gervilla *et al.*, 2000).

Para PAPH se estima que, a mayor complejidad de composición del alimento, el efecto baroprotector se incrementa, en particular cuando poseen

Antecedentes

medios ricos en micronutrientes como aminoácidos esenciales y vitaminas que pueden promover la viabilidad de células estresadas o de minerales (calcio, magnesio) que pueden reforzar las membranas microbianas, previniendo su lisis (Considine *et al.*, 2008). De igual manera, como el HAP puede emplearse como una barrera de conservación para métodos combinados, medios con menor actividad de agua y pH sensibilizan a la célula contra los efectos de la alta presión, así como el uso de barreras adicionales como antimicrobianos naturales (Pina-Pérez *et al.*, 2012) y sintéticos (Ogihara *et al.*, 2009). Para HAP, es de vital importancia la influencia de la composición sobre la viscosidad del medio. Al ser una tecnología basada en el flujo de fluidos, la viscosidad influye en la efectividad de la inactivación microbiana por HAP; fluidos muy viscosos pueden inhibir la cavitación y afectar la turbulencia, los gradientes de presión y la presión de impacto en el anillo (Diels y Michiels, 2006). Diels *et al.* (2005), empleando suspensiones en buffer de *E. coli* ajustadas a diferentes viscosidades relativas encontraron que la inactivación microbiana por HAP (100-300 MPa) disminuía con el incremento de viscosidad. Al comparar la letalidad de la bacteria en tres productos alimenticios (leche descremada, leche de soya, bebida láctea de frutas) con misma viscosidad relativa que los buffers ajustados, los autores obtuvieron resultados muy similares, concluyendo que eran las diferencias en viscosidad (y no las diferencias en composición) las que determinaban la magnitud de la inactivación. El HAP puede variar la viscosidad de los fluidos al modificar el tamaño de partícula de sus componentes o promover cambios en su conformación; en leche, esto incluye desnaturalización de proteínas séricas y formación de agregados de caseína (Pereda *et al.*, 2007). Esto a su vez puede afectar el flujo del fluido dentro del homogenizador y con ello, todos los fenómenos reológicos involucrados con la inactivación microbiana. Por otra parte, la viscosidad de los líquidos es dependiente de la temperatura; dado que la HAP propicia el calentamiento de los fluidos presurizados, la viscosidad de estos últimos variará dependiendo de la intensidad del proceso. La temperatura es uno de los factores que afecta la inactivación microbiana en procesos de HAP; sin embargo, algunos resultados sugieren que su efecto puede explicarse por su influencia indirecta sobre la viscosidad del fluido (Diels *et al.*, 2004).

2.3.1.3 Parámetros de proceso

Los principales parámetros que determinan la eficiencia de un PAP son la presión de operación y la temperatura de proceso; en PAPH el control del tiempo de proceso resulta esencial; asimismo, se ha explorado el uso de pulsos repetidos de presión, donde son relevantes el número y la duración del pulso y la velocidad de incremento de presión (Donsi *et al.*, 2007); por su parte, en el HAP influyen el diseño de la válvula de alta presión (Donsi *et al.*, 2013), el número de pases o recirculaciones del fluido a presurizar (Picart *et al.*, 2006) así como la Ts del fluido (Datta *et al.*, 2005). En términos generales, se aumenta la inactivación microbiana conforme se incrementa la magnitud de estas variables, aunque dependiendo del tipo de producto, existe un nivel crítico para estos parámetros, a partir de los cuales el efecto de inactivación no varía más.

Se ha observado que el PAPH puede causar daño subletal en microflora naturalmente resistente, lo cual resulta de interés pues posibilita la reactivación de microorganismos durante el almacenamiento de productos presurizados. Bozoglu *et al.* (2004) distinguen tres categorías de células sobrevivientes tras un PAPH: activas (resistentes a la alta presión y capaces de crecer en medios selectivos y no selectivos), con daño moderado (capaces de formar colonias en medios no selectivos tras cierto tiempo de recuperación, pero inhibidas en medios selectivos) y con daño intenso (aquellas que no son capaces de crecer en ningún medio, pero que bajo condiciones apropiadas pueden recuperarse y eventualmente crecer en medios no selectivos primero, y selectivos, más tarde). La presencia de daño subletal y resistencia variable entre cepas, así como la barorresistencia adquirida por mutación en ciertas especies microbianas dificulta la eliminación de microorganismos por PAPH. Una de las maneras para sobrepasar estas limitaciones es acoplar el PAPH con otros factores de conservación dentro del contexto de tecnología de obstáculos (Torres y Velázquez, 2005). Algunas de las barreras investigadas incluyen tratamientos térmicos de alta y baja intensidad (Mújica-Paz *et al.*, 2011), bacteriocinas (Pathanibul *et al.*, 2009), antimicrobianos sintéticos y naturales (Hofstetter *et al.*, 2013), aunque evidencia reciente sugiere que el PAPH provoca acidificación de diversos productos alimenticios fluidos y

limita el efecto sinérgico de ácidos orgánicos antimicrobianos (Samaranayake y Sastry, 2012). El uso de temperaturas de refrigeración en productos sometidos a PAPH puede hacer más eficiente la inactivación de microorganismos selectos (De Iamo-Castellví, 2006)

El impacto de los parámetros del PAP es similar para PAPH y HAP. En términos generales, la inactivación microbiana por HAP se incrementa con la presión (Calligaris *et al.*, 2012; Campos y Cristianini, 2007; Briñez *et al.*, 2006; Tahiri *et al.*, 2006), temperatura de proceso (Diels *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2002) y el número de pases (Patrignani *et al.*, 2013; Maresca *et al.*, 2011; Patrignani *et al.*, 2009; Picart *et al.*, 2006; Wuytack *et al.*, 2002; Kheadr *et al.*, 2002), pero la magnitud observada depende directamente del tipo de fluido estudiado, del microorganismo más barorresistente presente y del equipo empleado. Los primeros trabajos de inactivación microbiana con HAP datan de inicios de los 1990's, empleando presiones máximas de operación de ~100 MPa; las reducciones obtenidas en cuentas de microorganismos selectos estuvieron en el rango de 1-3 log₁₀; así, se reportan reducciones de esa magnitud en cuentas de *Streptococcus lactis* (1 log₁₀), *E. coli* (3 log₁₀), *Bacillus subtilis* (3 log₁₀) (Popper y Knorr, 1990), *L. monocytogenes* (2 log₁₀) y *Y. enterocolitica* (3 log₁₀) (Lanciotti *et al.*, 1994). Desde entonces, las presiones de operación han aumentado considerablemente (P=100-350 MPa), aunque algunos autores consideran que el efecto antimicrobiano no varía de manera lineal con la presión, sino que existe una cierta presión de umbral, después de la cual las disminuciones en población microbiana dejan de ser significativas (Diels y Michiels, 2006).

La Ti de la matriz alimenticia representa un factor relevante para la inactivación microbiana por HAP. Se ha sugerido que la máxima resistencia microbiana a la alta presión se logra a temperatura ambiente, dado que los lípidos de las membranas bacterianas se encuentran en su estado de mayor permeabilidad y flexibilidad, mientras que temperaturas bajas (4°C) y moderadamente altas (alrededor de 40°C) hacen más susceptibles a los microorganismos al daño por alta presión. Las primeras propician la cristalización parcial de los fosfolípidos, haciendo más rígida a la membrana; las segundas debilitan puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y pueden desnaturalizar proteínas de la misma (Vachon

et al., 2002; Gervilla *et al.*, 2000). Esto, sin embargo, puede variar dependiendo del tipo de microorganismo. Aunque por lo regular el fluido se enfría inmediatamente buscando minimizar el impacto térmico sobre las demás características del alimento, en algunos casos se estima conveniente mantener la T_s durante cierto tiempo antes del enfriamiento para maximizar la letalidad microbiana, aprovechando el calentamiento adiabático inherente al proceso (Belloch *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2005). Se ha reportado que determinadas combinaciones de presión de operación de HAP y T_i , con y sin enfriamiento instantáneo, son adecuadas para producir alimentos con vida de anaquel similar o mayor a productos pasteurizados (Cerdán-Calero *et al.*, 2012) o ultrapasteurizados (Poliseli-Scopel *et al.*, 2012) y permiten lograr reducciones en cuentas de esporas, usualmente resistentes a HAP (Dumay *et al.*, 2013).

Se ha observado que el uso de pases múltiples de HAP incrementa la inactivación microbiana en diversos alimentos. Generalmente, se propone emplear menores presiones de operación (100-200 MPa) en oposición a pases sencillos a presiones mayores (250-350 MPa), buscando lograr reducciones equivalentes en la población microbiana, mientras se minimiza el impacto del proceso sobre características sensoriales y funcionales del producto. Dado que el precio de los homogenizadores se incrementa con la presión máxima a la cual pueden operar, este esquema posibilita emplear equipos de menor costo y obtener resultados equiparables en términos de inactivación microbiana.

2.3.2 Procesos a alta presión e inocuidad microbiana de leche

De acuerdo al Codex Alimentarius, los parámetros de pasteurización de leche se fijaron para eliminar a *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*. Tanto la pasteurización por lotes (LTLT) como la continua (HTST) garantizan una disminución mínima de ~5 ciclos \log_{10} del patógeno más termorresistente (*C. burnetii*), siendo que la máxima cuenta detectada en leche es de 10^4 . Estas condiciones resultan adecuadas para la inactivación de otros patógenos de leche como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 (Cerf y Condron, 2006). Sin embargo, dado que los

mecanismos de inactivación microbiana por PAP son diferentes a aquellos del tratamiento térmico, se han realizado múltiples estudios sobre el efecto de PAP sobre microorganismos inoculados (patógenos o sucedáneos no patógenos) y flora nativa de leche; asimismo, se han evaluado posibles efectos sinérgicos con otros factores de conservación (Buffa, 2003).

En la Tabla 2.6 se presentan resultados de inactivación de microorganismos específicos inoculados en leche estéril y tratada por PAPH. Es importante hacer notar que las diferencias sustanciales en letalidad entre experimentos con los mismos microorganismos se atribuyen al uso de cepas de barorresistencia diferente. Por otra parte, ciertas células pueden presentar daño subletal de diferente magnitud y no ser consideradas en los recuentos, dependiendo del uso de medios de cultivo selectivos o de las condiciones de almacenamiento post proceso. Ambos factores influyen en la tasa de recuperación de células dañadas y pueden producir cuentas microbianas poco precisas (Patterson, 2005; Bozoglu *et al.*, 2004). En términos generales se puede observar que determinadas cepas de *S.aureus* destacan por su barorresistencia; sus implicaciones sobre la inocuidad de productos PAP ha sido confirmada en trabajos posteriores (Yang *et al.*, 2012; Cebrián *et al.*, 2010).

En cuanto a HAP, Vachon *et al.*, (2002) exploraron la inactivación de *L. monocytogenes* y *E. coli* 0157:H7 inoculadas en leche cruda, empleando diferentes presiones de operación (100, 200, 300 MPa) y número de pases (1, 3, 5), donde la primera exhibió mayor barorresistencia, pues se observó una disminución de 5.6 log₁₀ UFC/ml con 300 MPa, 5 pases mientras que 200 MPa, 5 pases generaron una disminución de 8.3 log₁₀ UFC/ml en la segunda. La letalidad del proceso se incrementó con la presión y el número de recirculaciones. Briñez *et al.* (2007) reportaron un efecto significativo de Ti (6, 20°C) sobre la reducción logarítmica de cuentas de *S. aureus* ATCC 13565 inoculado en leche entera (3.35 y 4, respectivamente) y procesada a 300 + 30 MPa, lo cual demuestra que éste patógeno también es resistente a la presión dinámica. Diels *et al.* (2003) estudiaron el efecto de combinaciones de presión de operación (100-300 MPa) y Ti (5-50°C) sobre la sobrevivencia de *S. aureus* y *Y. enterocolitica*, encontrando que aquellas entre 5 y 40°C no afectaban la inactivación del primero, aún a presiones tan altas

como 300 MPa; mientras tanto, el efecto de la presión sobre *Y. enterocolitica* se hacía mucho más pronunciado con incrementos de Ti, aún en el rango bajo. La HAP parece insuficiente como método único de conservación de leche de vida de anaquel extendida, pues tratamientos sumamente intensos (300 MPa, 16 pases) resultaron insuficientes para reducir de manera importante las cuentas de esporas de *B. stearothermophilus* (0.67 ciclos log₁₀) en leche descremada cuando se minimizaba el calentamiento adiabático (Pinho *et al.*, 2011a).

TABLA 2.6 Sensibilidad al PAPH de patógenos inoculados en leche entera

Microorganismo inoculado	Condiciones (MPa, min)	T ¹ (°C)	Red log ₁₀ ²	Referencia
<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12079	600, 15	20	1.75	Patterson <i>et al.</i> , 1995
<i>E. coli</i> MG 1655	600, 15	20	3	García-Graells <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i>	400, 15	25	3	Dogan y Erkmen, 2003
<i>E. coli</i> K12 ATCC 29055	300, 5	25	1.5	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2009
<i>L. monocytogenes</i>	344, 80	23	6	Styles <i>et al.</i> , 1991
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	500, 35	23	8	Chen y Hoover, 2003
<i>L. monocytogenes</i> 4a KUEN 136	600, 16	25	7	Dogan y Erkmen, 2004
<i>Mycobacterium</i> <i>avium</i> ssp <i>paratuberculosis</i>	500, 10	20	6.5	Donaghy <i>et al.</i> , 2007
<i>S. aureus</i>	250, 12	20	4	Erkmen y Karatas, 1997
<i>S. aureus</i>	600, 15	20	2	Patterson <i>et al.</i> , 1995
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> ³	400, 10	20	7	De Lamo-Castellví <i>et al.</i> , 2005

¹ Temperatura; ² Reducciones logarítmicas aproximadas; ³ En leche descremada

Antecedentes

Los estudios de reducción de cuentas de microorganismos nativos en leche por PAP buscan definir parámetros de proceso que produzcan resultados equivalentes a los obtenidos mediante pasteurización térmica. Mussa y Ramaswamy (1997) obtuvieron una reducción de 4 log₁₀ en cuentas de bacterias mesófilas aerobias (BMAs) de leche PAPH a 350 MPa, 32 min, insuficiente para equipararse a una pasteurización térmica comercial (≥ 5 log₁₀). Buffa *et al.* (2001a) obtuvieron leche de cabra presurizada (500 MPa, 20°C, 15 min) con calidad microbiológica muy similar a la de leche HTST en términos de cuentas de BMAs, coliformes, psicrótrofos, enterococos, micrococos y lactobacilos. De manera alterna, Drake *et al.* (1997) proponen el uso de ciclos de alta presión (586 MPa, 1 min) para obtener reducciones de cuentas de BMAs, coliformes y psicrótrofos análogas a un proceso HTST de leche, mientras que Dogan y Erkmen (2003) definieron que condiciones de 600 MPa, 30 min como las requeridas para obtener leche con una calidad microbiológica similar a la UHT. Lopez-Fandiño *et al.* (1996) reportan un mejoramiento mínimo en la calidad microbiológica de leche, con disminuciones idénticas (1.3 ciclos log₁₀) en cuentas de BMAs y psicrótrofos tras 30 min de PAP a 400 y 200 MPa, respectivamente. Estos autores reportan una disminución importante de la microflora durante el inicio del proceso (15-20 min), a partir del cual no se observó un incremento significativo en letalidad. Estas colas de microorganismos sobrevivientes se han observado en otras investigaciones de PAPH (Chen y Hoover, 2003; Gervilla-Fernández, 2001; Patterson *et al.*, 1995) aunque en otras la muerte microbiana sigue una cinética de primer orden (Mussa y Ramaswamy, 1997); a la fecha, se considera que la cinética de inactivación es variable y depende de la heterogeneidad de la población microbiana o de una posible adaptación a las condiciones del proceso; las cinéticas de inactivación microbiana que presentan colas se ajustan mejor a distribuciones no lineales, como la de Weibull (Chen y Hoover, 2003).

Picart *et al.* (2006) determinaron el efecto de la HAP (P=100-300 MPa; T=24°C; 1-3 recirculaciones a 200 MPa) sobre la microbiota nativa de la leche; las reducciones log₁₀ se incrementaron de 1 a 150 MPa a 2.9 a 300 MPa, con un solo pase; por su parte, HAP a 200 MPa aumentó su letalidad de 1.4 a 2.8 reducciones log al aplicar 1 y 3 recirculaciones respectivamente; esto implica que la letalidad del

proceso a 300 MPa/1 pase era similar a aquella reportada a 200 MPa/3 pases. En cuanto a los microorganismos de interés en leche, existen evidencias de la efectividad de los tratamientos HAP contra *Pseudomonas* spp. (Hayes *et al.*, 2005; Wuytack *et al.*, 2002), coliformes (Hayes *et al.*, 2005; Vachon *et al.*, 2002), lactobacilos (Thiebaud *et al.*, 2003; Bury *et al.*, 2001) y *S. aureus* (Hayes *et al.*, 2005). Otro factor a considerar es el calentamiento adiabático que sufre el fluido cuando sale de la válvula de homogeneización, el cual depende de T_i , y para leche tiene una magnitud de 16-19°C por cada 100 MPa de incremento de presión (Pereda *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2005; Thiebaud *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2003a). El efecto que posee sobre la letalidad es difícil cuantificarlo, debido a la posibilidad de que se presenten microzonas de mayor calentamiento dentro del flujo (Datta *et al.*, 2005). Briñez *et al.* (2006) sugieren emplear temperaturas de alimentación de leche mayores a 20°C si se desea alcanzar letalidades microbianas comparables a una pasteurización. Sin embargo, a la fecha sólo dos trabajos exploraron la viabilidad de HAP como una alternativa a la pasteurización térmica de leche, llegando a conclusiones muy diferentes. Smiddy *et al.* (2007) reportan 5 reducciones \log_{10} en cuentas estándar de leche presurizada a 200-250 MPa; sin embargo, la T_i fue considerablemente alta (55-70°C) por lo que el componente térmico de la inactivación contribuyó de manera importante en la letalidad del proceso; aunque la inactivación microbiana alcanzada es comparable a la de un proceso HTST, la vida de anaquel resultante fue menor. Aunque las cuentas de todos los grupos de microorganismos investigados (BMAs, psicrótrofos, coliformes, lactobacilos, *B. cereus*, *S. aureus*) estaban por debajo del límite de detección inmediatamente después del tratamiento, psicrótrofos y pseudomonas aumentaron su población a 10^7 UFC/ml tras 11d de almacenamiento refrigerado. Comparativamente, una leche pasteurizada comercial presentó cuentas en el orden de 10^5 UFC/ml tras 14 d de almacenamiento, aunque no se descartó una contaminación post-proceso. Mientras tanto, Pereda *et al.* (2007) aplicaron tratamientos HAP a 200-300 MPa, y a T_i de 30-40°C obteniendo una reducción máxima de 3.5 ciclos log de BMAs (análoga a la obtenida con un proceso térmico de 90°C, 15s, dado que el envasado no fue aséptico, una recontaminación postproceso no se descarta). Por otra parte, la reducción de psicrótrofos, esporas y lactococos fue de igual o mayor magnitud como en una pasteurización térmica y

los coliformes, lactobacilos, enterococos y *Pseudomonas* fueron eliminados y no se detectó su crecimiento durante el almacenamiento refrigerado. A los 14 d de almacenamiento, ninguna de las cuentas microbianas excedía 10^4 UFC/ml y la vida de anaquel se fijó en 14-18 días para todas las leches presurizadas. Incluso, la leche HAP a 200 MPa/30°C exhibió la vida de anaquel más larga (21 d), fenómeno atribuido a cierta actividad residual de lactoperoxidasa. A partir de los resultados de este trabajo, el mismo grupo de investigación ha propuesto condiciones de 300 MPa, 30-40°C, un solo pase como las adecuadas para obtener leche HAP con características microbiológicas y funcionales similares a una leche HTST y han descrito su composición de componentes volátiles (Pereda *et al.*, 2008a), actividad enzimática proteolítica (Pereda *et al.*, 2008b) y lipolítica (Pereda *et al.*, 2008c) y la magnitud del daño térmico asociado (Pereda *et al.*, 2009). Recientemente, se han explorado T_i 's elevadas (55-85°C) a P de 200 y 300 MPa con la finalidad de producir leche comercialmente estéril (Amador-Espejo *et al.*, 2014).

2.3.3 Cambios en actividad enzimática

La leche contiene una gran variedad de enzimas; algunas de ellas son nativas (proviene de la glándula mamaria) y otras son exógenas, fundamentalmente enzimas termoestables de origen microbiano, fundamentalmente de psicrótrofos que crecen durante el almacenamiento refrigerado, y que se integran a la leche después de la lisis bacteriana (lipasas y proteinasas). Muir (1996) distingue cuatro tipos de actividad enzimática de origen microbiano: fermentación de lactosa, hidrólisis lipídica, actividad proteolítica y degradación de la membrana de glóbulos grasos por fosfolipasas. En cuanto a su localización, se pueden encontrar dispersas en el suero (fase acuosa), asociadas con la membrana del glóbulo graso (fase lipídica) o parcialmente unidas a las micelas de caseína. Las enzimas pueden alterar a la leche durante el almacenamiento; por ello, se busca inactivarlas, usualmente por medios térmicos (Walstra *et al.*, 2006) aunque varios trabajos establecen el potencial del PAP como tratamiento alterno (Hendrickx *et al.*, 1998; Johnston, 1995). En realidad, existe evidencia de inactivación o activación de la actividad enzimática dependiendo del tipo de enzima, temperatura, tiempo y rango de presión utilizado (Huppertz *et al.*,

2004a); asimismo, el efecto puede ser reversible o irreversible, y parcial o total (Gervilla, 2001). Tanto en procesos térmicos como en PAP, la inactivación enzimática en leche está asociada primordialmente a la desnaturalización proteica. La estructura primaria de las proteínas, al estar estabilizada por enlaces covalentes, no es afectada por el PAP a los niveles de presión empleados (<1000 MPa); mientras tanto, la estructura secundaria, dependiente de enlaces puente de hidrógeno, requiere de presiones muy elevadas, usualmente incosteables en el ámbito industrial, para alterarse. La mayoría de los cambios, reversibles e irreversibles, resultan de la modificación de las estructuras terciaria y cuaternaria, dependientes de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, las cuales tienden a romperse al someterse a alta presión. De manera similar a un proceso térmico, la estabilidad enzimática ante un PAP depende de múltiples factores intrínsecos (estructura de la enzima, pH) y extrínsecos (presión de proceso, temperatura de operación). Algunas enzimas se inactivan a presiones relativamente bajas (100-200 MPa), mientras que otras resisten presiones superiores a 1000 MPa (de PAPH), por lo que el uso de procesos combinados es requerido con frecuencia (Bilbao-Saínz *et al.*, 2009; Hendrickx *et al.*, 1998). La actividad enzimática también puede verse reducida si el proceso afecta el sitio de acción de la enzima por cambio estructural, por impedimento estérico o por formación de interacciones entre la enzima y otra fracción proteica desnaturalizada por el proceso (Buffa, 2003; Gervilla, 2001).

El estudio del efecto del PAPH sobre la actividad enzimática de leche se ha centrado en enzimas nativas, como plasmina, lactoperoxidasa (LP), lipasa lipoproteica (LLP) y fosfatasa alcalina (FA), y desde dos perspectivas distintas: para establecer indicadores de la efectividad del PAPH y para conocer los posibles efectos del cambio en actividad enzimática sobre la calidad de productos lácteos (Rademacher y Hinrichs, 2006). En términos generales se considera que la barorresistencia de las enzimas nativas es elevada, pues la mayoría soportan tratamientos PAPH de hasta 400 MPa (Huppertz *et al.*, 2006). La plasmina es la proteasa más abundante en leche fluida, con actividad importante sobre β -caseína y capaz de degradarla durante periodos de almacenamiento prolongado; su nivel de actividad está regulado por el balance entre un sistema complejo, conformado

Antecedentes

por la enzima, su precursor (plasminógeno), activadores de plasminógeno e inhibidores de activadores de plasminógeno con distintos niveles de termorresistencia (Muir, 1996). Al pH nativo de leche bovina (6.6) la plasmina es altamente termoestable, por lo que su barorresistencia ha sido explorada. Lopez-Fandiño *et al.* (1996) no observan diferencias en actividad proteolítica atribuida a plasmina entre leche PAPH hasta 400 MPa y leche cruda. Huppertz *et al.* (2004a) reportan reducciones de hasta el 75% de la actividad de plasmina con 30 min a 20°C de PAPH a 600 MPa mientras que 250 MPa la enzima no se vio afectada y presiones en el rango de 300-400 MPa aceleraron su actividad proteolítica. Por su parte, Scollard *et al.* (2000) observaron una mayor barorresistencia de la enzima, pues leche PAPH a 600 MPa, 35 min exhibió una actividad enzimática residual de aprox. 50%, aunque la actividad proteolítica aumento tras aplicar el mismo rango de presión (300-400 MPa); este fenómeno se le atribuyó a una combinación de baja inactivación de plasmina y una mayor área de caseína disponible para hidrólisis por rompimiento micelar. Según García-Risco *et al.* (2000), la inactivación de plasmina se incrementa con la temperatura de proceso (86.5% tras 400 MPa, 15 min, 60°C. La actividad de la plasmina también se reduce por presencia de β -lactoglobulina (BLG) desnaturalizada en la pasteurización se observa hasta un 30% de disminución en la actividad de plasmina por formación de enlaces disulfuro con BLG desnaturalizada por el tratamiento térmico, aunque su actividad aumenta durante incubación posterior a 20-37°C, por efecto de la inactivación de los inhibidores de plasminógeno (Grappin y Beuvier, 1997). El PAPH tiene el potencial de desnaturalizar a BLG a través de una modificación irreversible de su estructura (ver Sección 2.3.4); aunque se piensa que la inactivación de plasmina se puede dar por un mecanismo similar al observado en la pasteurización, se requiere más investigación para comprobar esta aseveración (Scollard *et al.*, 2000).

En el tratamiento térmico de leche, las enzimas usualmente empleadas como indicadores de intensidad de proceso son fosfatasa alcalina (para HTST) y lactoperoxidasa (en tratamientos UHT); asimismo, algunos estudios han analizado su barorresistencia y por tanto su viabilidad para medir la efectividad del PAPH. La fosfatasa alcalina (FA), normalmente localizada en la membrana de los glóbulos grasos y cuya inactivación térmica garantiza la destrucción de todos los patógenos

y la mayoría de las bacterias Gram negativas y acidolácticas, posee una barorresistencia considerable. Johnston (1995) determinó el % de actividad relativa de FA tras 20 min de PAPH de 100 a 800 MPa. Más del 50% de la enzima continuaba activa tras aplicar 500 MPa y la inactivación prácticamente completa se logró con el proceso a 800 MPa. Rademacher y Hinrichs (2006) reportan condiciones similares de inactivación total y PAPH's de 550 MPa/40min y 600 MPa/20min para inactivar 50% de la enzima. Mussa y Ramaswamy (1997) definieron parámetros cinéticos para FA que van de 200 MPa ($D=1039$ min) a 400 MPa ($D=301$ min), con $Z=398$ MPa. Estos resultados aportan evidencia adicional de su barorresistencia y plantea la imposibilidad de emplear la prueba de FA como un indicador de efectividad del PAPH, dado que la enzima no es inactivada por completo en los rangos de presión comercialmente viables y los tratamientos requeridos redundarían en un sobreproceso (Rademacher y Hinrichs, 2006). La lactoperoxidasa (LP) tiene la capacidad de promover la oxidación de ácidos grasos insaturados, con el consecuente desarrollo de sabores desagradables en leche. Sin embargo, también posee actividad bactericida importante contra diversos microorganismos patógenos y deteriorativos (Muir, 1996). La barorresistencia de LP es aún mayor que la de FA. Un PAPH de 400 MPa por 60 min no disminuyó la actividad de LP (Lopez-Fandiño *et al.*, 1996), ni tampoco presiones de hasta 700 MPa en un rango de temperatura de 20-65°C (Ludikhuyze *et al.*, 2001). Ludikhuyze *et al.* (2000) consideran que combinaciones selectas de presión y Ti en PAPH conllevan a la conservación de la actividad de LP y FA. Por ejemplo, PAPH's menores de 200 MPa acoplados a tratamientos térmicos en el rango de 25-63°C evitan el daño térmico de FA.

Otras enzimas exploradas como posibles indicadores del PAPH incluyen xantinoxidasa, fosfohexoseisomerasa, g-glutamilttransferasa, lipasa y fosfatasa ácida (Huppertz *et al.*, 2006) pero a la fecha no existe evidencia conclusiva que establezca un indicador enzimático fiable para el PAPH y se requiere más investigación al respecto. (Lopez-Fandiño y Michiels, 2006). De entre las anteriores, la xantinoxidasa resulta promisoría. Esta enzima termorresistente puede encontrarse en forma libre o ligada a la membrana del glóbulo graso y cataliza la oxidación no específica de numerosos compuestos en la leche (Muir, 1996). De

acuerdo a Olson *et al.* (2004), la xantinoxidasa es capaz de resistir PAPH's de 400 MPa, pero a presiones mayores se inactiva siguiendo una cinética de primer orden.

Los cambios en actividad enzimática relacionados con la aplicación de alta presión dinámica también se han explorado. Hayes *et al.* (2005) estudiaron las actividades residuales de tres enzimas lácteas nativas (plasmina, FA y LP) comparando procesos HAP (150, 200 y 250 MPa; $T_i = 45^\circ\text{C}$) con leche pasteurizada comercial. La actividad enzimática en leche HAP a 250 MPa fue sumamente baja (nula para FA y LP y 4.25% de plasmina) mientras que LP y plasmina mantuvieron aprox. 11 y 36% de su actividad residual en leche HTST; sin embargo, considerando la magnitud de T_s para este proceso HAP (84°C) y el tiempo promedio de retención (20s) la carga térmica asociada resultó considerablemente mayor que la de un proceso HTST. Por tanto, la proporción de la inactivación enzimática por HAP atribuible al componente térmico de la misma se necesita establecer con claridad. Así, Datta *et al.* (2005) determinaron el efecto de T_i de leche ($10\text{-}50^\circ\text{C}$) sobre la actividad residual de LP, FA, LLP y plasmina con HAP=200 MPa. Además, establecieron la actividad enzimática residual de leche cruda procesada térmicamente con condiciones equivalentes de tiempo/temperatura a las registradas como consecuencia de cada proceso HAP. Al comparar ambas actividades, se podía establecer si la contribución de la HAP a la disminución de actividad enzimática era significativa. La FA resultó ser únicamente afectada por el calentamiento, como también lo establecieron otros autores (Pinho *et al.*, 2011b); la barorresistencia de FA también fue reportada por Hayes y Kelly (2003b), quienes encontraron actividad residual después de HAP a 50-200 MPa con temperaturas de entrada de $6\text{-}9^\circ\text{C}$, aunque la prueba fluorométrica que emplearon es cualitativa y no se descarta una disminución de actividad a mayores magnitudes de presión. Picart *et al.* (2006) refuerzan aún más el papel determinante de la temperatura en la inactivación de FA por HAP; la actividad de la enzima apenas disminuyó $P > 250$ MPa cuando T_i fue de 4°C (con T_s de 58°C); sin embargo, disminuyó considerablemente con HAP por encima de 200 MPa cuando la T_i fue de 24°C , y, en consecuencia, las temperaturas de salida fueron $>60^\circ\text{C}$. Esta resistencia a la alta presión se asemeja a la que FA exhibe al PAPH (Rademacher y Hinrichs, 2006). Por su parte, el perfil de inactivación de LP y plasmina en leche HAP fue

claramente diferente del observado en leche únicamente tratada térmicamente. LPO presentó una actividad residual marcadamente menor con HAP en relación a su contraparte térmica, con una mayor contribución térmica cuando $T_s > 70^\circ\text{C}$ (Pinho *et al.*, 2011b; Datta *et al.*, 2005). La actividad remanente de LP tras HAP de 150, 200, 250 MPa/45°C fue de 91, 34, 0%; salvo el proceso a 250 MPa, ninguno de los demás HAP's representa una reducción de actividad enzimática comparable a la de una pasteurización térmica comercial. El HAP indujo una reducción considerablemente mayor de plasmina, de manera análoga a lo reportado por Hayes *et al.* (2005); mientras tanto, procesos térmicos a 65 y 80°C redujeron la actividad de la enzima en 12 y 15% respectivamente, las HAP's a 200 MPa con temperaturas de salida similares la inactivaron en 74 y 90%, respectivamente. La reducción de la actividad de plasmina en leche homogeneizada está bien documentada; aún a presiones de homogeneización comercial (18 MPa), la reducción es de aproximadamente 40% (Hayes y Kelly, 2003b); por su parte, la pasteurización HTST únicamente la reduce aprox. 17% y la leche pasteurizada y homogeneizada un 70% (Hayes *et al.*, 2005); este fenómeno se le atribuye a la absorción de plasmina en glóbulos de grasa recién formados por la homogeneización; de hecho, el incremento en área superficial total de glóbulos de grasa (medido como disminución del tamaño promedio del glóbulo) se relaciona de manera aproximadamente lineal con la disminución en la actividad de la plasmina (Datta *et al.*, 2005). Finalmente, la LLP incrementó su actividad de manera significativa sin que el mecanismo relacionado se pudiera establecer claramente. Algunos autores (Zamora *et al.*, 2007; Pereda *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2005; Hayes y Kelly, 2003b) relacionan la disminución de pH que usualmente se observa en leche HAP tras 24 horas de almacenamiento con la actividad de LLP, la cual puede actuar sobre los glóbulos grasos y reducir el pH de la leche. Los únicos tratamientos que no presentan disminución de pH son aquellos que por su T_i o por su presión de operación garantizan una T_s similar a la de inactivación de LLP (72°C).

2.3.4 Efectos sobre componentes de la leche

Las principales modificaciones asociadas con el PAP en la estructura de componentes lácteos son los cambios proteicos (tamaño de las micelas de caseína

y desnaturalización de proteínas séricas) y cambios en el balance de minerales (Orlien *et al.*, 2006). Otro cambio importante se observa en el tamaño promedio y la distribución de tamaño de los glóbulos grasos. Estas alteraciones en la microestructura de leche se describirán a detalle a continuación.

2.3.4.1 Cambios proteicos

Las proteínas en leche se clasifican en dos grandes grupos heterogéneos, con base en su estabilidad a pH 4.6/ 30°C. Aproximadamente el 80% de la proteína presente precipitará por alcanzar su punto isoeléctrico (caseína) mientras que la fracción remanente permanecerá en solución (proteínas séricas).

Las caseínas son fosfoproteínas, bajas en azufre y altamente termoestables; sintetizadas de manera exclusiva en la glándula mamaria, poseen estructuras cuaternarias complejas y están organizadas en agregados coloidales altamente hidratados conocidos como micelas (Fox y McSweeney, 1998). Las micelas de caseína contienen cuatro fracciones diferentes, denominadas α_{s1} -, α_{s2} , β - y κ -caseína y su tamaño promedio se estima en el rango de 150 a 200 nm (Orlien *et al.*, 2006; Buffa, 2003). En base seca, las micelas poseen aproximadamente 7% de materia inorgánica (calcio, fósforo y pequeñas cantidades de magnesio y citrato) conocida como fosfato de calcio coloidal (FCC) y con un papel relevante en la estabilidad de la micela (De Kruiff *et al.*, 2012). El modelo más aceptado de estructura micelar, conocido como de nanoconglomerados, describe a la micela como una matriz de fracciones de caseína con aglomerados de FCC de aproximadamente 2 nm de diámetro dispersos por toda su estructura, con un promedio de 285 unidades por micela; alrededor del FCC se unen las fracciones de caseína a través de 3-5 aminoácidos fosforilados; la asociación entre las fracciones se realiza mediante diversas interacciones débiles, incluyendo hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y electrostáticas (De Kruif *et al.*, 2012; Huppertz *et al.*, 2006). La micela de caseína se estabiliza por κ -caseína (específicamente por la presencia de su sección hidrofílica poco afín al calcio conocida como capa *pilosa*), FCC e interacciones hidrofóbicas (Roach y Harte, 2008).

Antecedentes

Los efectos del PAP sobre proteínas lácteas se han estudiado de manera extensiva en leche y dispersiones acuosas de concentrados proteicos; las técnicas instrumentales implementadas para estos estudios han sido revisadas por Considine *et al.* (2008), los cuales las clasifican en las siguientes categorías: de dispersión de tamaño, incluyendo dispersión luminosa y de dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS); para determinar cambios en la estructura secundaria, que comprende cristalografía de rayos x, espectroscopía de dicroísmo circular UV lejano, espectroscopía de resonancia magnética nuclear multidimensional y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). La sensibilidad de esta última se ha incrementado en épocas recientes al acoplarse con técnicas de análisis multivariado, conocidas de forma conjunta como análisis quimiométrico (Nicolau *et al.*, 2010). Para determinar cambios en estructura terciaria, con métodos de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular inducido; otras técnicas instrumentales comunes incluyen a la cromatografía de exclusión por tamaño y a la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). El tamaño promedio de la micela de caseína se puede determinar también por espectroscopía de correlación de fotones (Huppertz *et al.*, 2008; Anema, 2008; Anema *et al.*, 2005; Hayes y Kelly, 2003a).

Los cambios en caseína por PAP se clasifican en tres categorías: efecto sobre el tamaño micelar (TM), efecto sobre el número de micelas por unidad de volumen y en la proporción de caseína micelar; estas tres se hayan relacionadas (Huppertz *et al.*, 2006), aunque el que ha sido más explorado es el primero de ellos, el cual fue mencionado por primera vez por Hite (1899). El TM cambia por efecto del PAPH, disminuyendo en ciertos rangos de P (<300 MPa) y t, y aumentando en otros (p.e., a P=250 MPa). En términos generales, las presiones menores a 250 MPa no afectan el TM. El mecanismo que controla este fenómeno no se ha entendido en su totalidad, pero se ha asociado con solubilización de FCC (y el consecuente rompimiento de sus interacciones con las fracciones de caseína), rompimiento o debilitamiento de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre las diferentes fracciones micelares y compresión (Dumay *et al.*, 2013; Huppertz y de Kruiff, 2006; Huppertz *et al.*, 2004c; Needs *et al.*, 2000; López-Fandiño *et al.*, 1998). La solubilidad del FCC se incrementa con la presión y es inversamente

proporcional al pH (por cambios en el equilibrio mineral) y a la concentración micelar. Cada una de las caseínas posee una tasa de disociación micelar (TDM) diferente. La TDM es la capacidad de las fracciones de caseína de permanecer como parte de la micela y se relaciona con el número de residuos (generalmente fosforilados) por fracción capaz de continuar ligando FCC. En leche bovina, la TDM para las fracciones de caseína por efecto de PAP es $\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$ (Huppertz *et al.*, 2002).

El cambio en TM a $P < 200$ MPa es mínimo (Anema *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2004b) mientras que PAPH a 250 MPa por más de 15 min lo aumenta considerablemente (hasta en 25%) y PAPH de 300-800 MPa reducen el TM hasta la mitad del original (Anema, 2008; Huppertz *et al.*, 2004b; Desobry-Banon *et al.*, 1994). Los efectos del PAPH en leche a esta presión son dependientes de otros factores relacionados como el pH y la Ti del producto (Huppertz *et al.*, 2006). Huppertz *et al.* (2004b) destacan también la influencia del pH de la leche sobre la estabilidad micelar. Con tratamientos a 250 MPa, acidificar la leche (pH 6.2) sensibilizó a la micela contra el PAPH, mientras que alcalinizarla (pH= 7.0) aumentó su estabilidad. En cuanto la influencia de Ti, a 5°C se redujo el TM a aproximadamente 50% del original, mientras que a 40°C lo aumentó en 150%. Resultados semejantes son reportados por Gaucheron *et al.* (1997) con reducción, sin cambio e incremento del TM tras PAPHs a 250 MPa a temperaturas de proceso de 4°C, 20°C y 40°C, respectivamente. La disminución e incremento del TM bajo las condiciones descritas se atribuyen a la solubilización parcial del calcio coloidal y a probables interacciones entre caseínas y proteínas de suero desnaturalizadas, respectivamente. Needs *et al.* (2000) consideran que la disociación micelar es completa a 400 MPa, lo cual fue posteriormente corroborado mediante pruebas de transmitancia, pues su magnitud medida inmediatamente después de procesar leche a 400 MPa fue idéntica a la del suero, lo cual se atribuyó a un rompimiento completo de la micela de caseína (Huppertz y de Kruiff, 2006). Gaucheron *et al.* (1997) consideran que a estos niveles de presión (< 400 MPa) el cambio en TM depende exclusivamente de la magnitud de presión independientemente de la temperatura de proceso; los parámetros que evaluaron fueron $P=450, 600$ MPa; $t=30$ min; 4, 20 y 40°C.

Antecedentes

Se ha reportado que los cambios en TM pueden ser reversibles (Orlien *et al.*, 2006); existe evidencia de reagregación de fragmentos micelares formados como consecuencia del PAPH hasta alcanzar dimensiones similares e inclusive mayores a los de las micelas nativas, particularmente a tiempos de procesamiento largos, a temperaturas por encima de la ambiental y en ciertos rangos de presión (Huppertz y de Kruif, 2006), probablemente por reabsorción de calcio micelar (Knudsen y Skibsted, 2010). Por ejemplo, PAPHs a 250-300 MPa disminuyen el TM; sin embargo, a $t > 10$ min, éste se incrementa nuevamente (Huppertz *et al.*, 2006; Orlien *et al.*, 2006) debido a una probable reagregación a partir de fragmentos de caseína resultantes del PAPH. Orlien *et al.* (2006) también reportan una fuerte influencia de T_i , pues a $P < 300$ MPa, el TM se incrementó y disminuyó con $T_i = 30^\circ\text{C}$ y $< 20^\circ\text{C}$, respectivamente. Además, a tiempos de PAPH muy largos (3-4 h) la distribución de TM se tornó bimodal con cada categoría marcadamente mayor (450-500 nm) y menor (40-60 nm) al TM nativo (~ 200 nm). Debido a la posibilidad de reagregación y dado que en ocasiones las determinaciones de TM suelen ser indirectas (a través de mediciones ópticas, como turbidez nefelométrica o transmitancia), los resultados pueden variar dependiendo de cuanto tiempo después del proceso se lleve a cabo el análisis.

Dado que la alta presión dinámica también afecta los sistemas de estabilización de la micela de caseína (Huppertz *et al.*, 2002), un cambio en la agregación o disgregación, y, en consecuencia, del TM es esperado. Sandra y Dalgleish (2005) observaron una reducción progresiva en el TM al incrementarse la presión (41-186 MPa), la temperatura de salida y de precalentamiento y el número de pases (1-6) en leche descremada en polvo reconstituida tratada por HAP. Con $T_i = 7^\circ\text{C}$, Hayes y Kelly (2003a) no observaron cambios en el TM con $\text{HAP} < 150$ MPa y sólo una disminución mínima (5%, de 181 a 171 nm) como consecuencia de $\text{HAP} = 200$ MPa, lo cual concuerda con los rangos de presión de PAPH en los que no hay un cambio significativo en este parámetro (Needs *et al.*, 2000). Los pases múltiples de HAP pueden afectar el TM de forma aditiva, dependiendo del rango de P empleado. Mientras Sandra y Dalgleish (2005) indujeron reducciones progresivas del TM nativo (214 nm) de leche en polvo reconstituida en aproximadamente 7, 10 y 11.5% con 2, 4 y 6 pases de HAP a 186 MPa, Kheadr *et al.* (2002) redujeron el

Antecedentes

TM de leche entera presurizada hasta 50% (300 a 150 nm) mediante pases múltiples (5) de HAP a 200 MPa, reportando que los fragmentos de caseína luego se integraron a la membrana de nuevos glóbulos de grasa producidos por la homogeneización. Se estima que la micela de caseína no se desintegra en el rango de presión dinámica de 180 a 200 MPa, si no que algunas fracciones (como κ - y α_{s1} -caseína) se pierden; esto eventualmente puede afectar la coagulación proteica necesaria para elaborar productos derivados como queso y yogurt. Resultados similares fueron obtenidos con leche descremada cruda presurizada a 179 MPa/25°C/6 pases y leche tratada térmicamente a 85°C por 10 min y posteriormente presurizada a las mismas condiciones. La leche HAP disminuyó el TM de 179 a 170.6 nm; mientras tanto, el tratamiento térmico incrementó el TM de leche cruda de 179 a 182.6 nm, pero la HAP posterior lo redujo nuevamente a 173.4 nm. Nuevamente, la reducción en TM se atribuyó a la pérdida de κ -caseína, o bien, de proteínas séricas unidas a las micelas de leche tratada térmicamente. Resultados completamente diferentes son reportados por Roach y Harte (2008) con leche descremada presurizada en un homogenizador *Stansted* a presiones de 100-350 MPa. HAP afectó en gran medida el TM, pues éste disminuyó aprox. 30% con 200 MPa (278 a 171 nm), mientras que a partir de 250 MPa el TM comenzó a incrementarse (178 nm) hasta a 350 MPa, donde alcanzó hasta el 75% (210 nm) del TM original. Las diferencias observadas son explicadas en términos del uso de leche descremada (no hay posibilidad de interacciones con glóbulos de grasa) para la disminución de TM hasta 200 MPa, mientras que el incremento de TM a partir de 250 MPa se atribuye al aumento de interacciones hidrofóbicas entre submicelas, y no a la formación de complejos con proteínas séricas, las cuales permanecieron con concentraciones constantes en el suero a todos los niveles de presión investigados.

Las proteínas de suero son globulares, altamente higroscópicas y menos resistentes a la desnaturalización térmica que las caseínas (Goff, 2013). Los grupos principales de proteínas séricas son BLG, α -lactalbúmina (ALA), albúmina sérica bovina (ASB) e inmunoglobulinas. Las dos primeras son las más abundantes (58 y 13% del total de proteínas de suero, respectivamente), poseen diferentes grados de resistencia a cambios externos y han sido las más estudiadas por ser las de

mayor impacto tecnológico en productos lácteos. Existe evidencia que BLG es mucho más barosensible que ALA (Scollard *et al.*, 2000), aunque el papel de las interacciones sulfhidrilo-disulfuro es de crucial en su desnaturalización (Huppertz *et al.*, 2004d). Lopez-Fandiño *et al.* (1996) reportan desnaturalización de BLG a $P > 100$ MPa a 25°C, mientras que un PAPH= 400 MPa/60 min no afectó sensiblemente a ALA. Por su parte, García-Risco *et al.* (2003) reportan porcentajes de desnaturalización de BLG de 14-16% a 200 MPa y de hasta 90% a 400 MPa tras 30 min de proceso. Huppertz *et al.* (2004c) obtuvieron ~100% de desnaturalización de BLG a 600 MPa/30 min/20°C; comparativamente 58% de ALA no se había afectado bajo esas mismas condiciones de proceso y se requirieron 800 MPa para desnaturalizar 72% de esta proteína. Dependiendo de las características de la leche, esta desnaturalización puede ser parcialmente reversible, por lo que su determinación, usualmente por cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC), debe hacerse a un tiempo fijo después de presurizada la leche. La mayor barorresistencia de ALA se le atribuye a una estructura secundaria rígida, a un mayor número de enlaces disulfuro intramoleculares (4 vs 2 de BLG), a la ausencia de sulfhidrilos libres (BLG posee uno) o la presencia de un sitio no expuesto ligante de calcio que incrementa considerablemente su estabilidad (Pattel y Creamer, 2009). Por su parte, la mayor sensibilidad de BLG se considera provocada por una cavidad hidroscópica en su estructura terciaria; como el PAP favorece la disminución del volumen por el principio de LeChatelier, la existencia de una cavidad no es favorable (Anema, 2012). BLG posee un grupo sulfhidrilo (SH) libre que juega un papel determinante en la agregación proteica catalizada por PAP (Lopez-Fandiño *et al.*, 2006). Por efecto del PAPH, BLG se desdobla, dejando expuesto a este grupo SH, el cual puede interactuar con proteínas que tengan disponible este mismo grupo (κ y α s1 caseínas, ALA, BLG) a través de enlaces disulfuro formados por reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro (Huppertz *et al.*, 2004d). Este mismo fenómeno se presenta como consecuencia del tratamiento térmico de leche y ha sido ampliamente estudiado (Goff y Hill, 1993); el mismo calentamiento concomitante al PAPH puede incidir sobre la tasa de desnaturalización de BLG. Las reacciones sulfhidrilo-disulfuro entre BLG y κ -caseína y la formación del complejo resultante, independientemente del

tratamiento que las propició, tienen implicaciones importantes en la funcionalidad de la leche y en sus aplicaciones tecnológicas, como se explicará más adelante.

De manera similar a como sucede con caseína, la barorresistencia de las proteínas séricas es dependiente de T_i y tiempo de proceso, del pH y equilibrio mineral del sistema y de la concentración proteica. Huppertz *et al.* (2004c) observan incrementos en la desnaturalización de BLG y ALA con $P > 100$ MPa y $P > 400$ MPa, respectivamente. Sin embargo, la magnitud de desnaturalización aumentó con el tiempo y la temperatura de proceso y con el pH de la leche ($7 > 6.7 > 6.2$). Se ha observado que los porcentajes de ALA y BLG desnaturalizadas aumenta con la presencia de FCC (Huppertz *et al.*, 2004d). Con 600 MPa/30 min, el porcentaje de ALA y BLG desnaturalizadas se incrementa 19% y 69% respectivamente en leche libre de FCC, mientras que en presencia de FCC se incrementa a 33% y 99% respectivamente. Esto se atribuye a que el PAPH induce solubilización del FCC y, a su vez, el calcio soluble reduce la carga neta de las proteínas séricas desdobladas, disminuyendo la repulsión electrostática, aumentando así su acercamiento y posibilitando la ocurrencia de reacciones sulfhidrilo-disulfuro, que incrementan la desnaturalización proteica.

Por otra parte, se han estudiado los cambios estructurales de proteínas globulares en leche sometida a HAP. Subirade *et al.* (1998) no observaron cambios en la estructura secundaria de BLG proveniente de un aislado proteico rehidratado y sometido a HAP=140 MPa sin precalentamiento; resultados similares fueron reportados por Hayes y Kelly (2003a) a rangos mayores de presión (200 MPa). Hayes *et al.* (2005) estimaron la desnaturalización de BLG y ALA por HAP empleando RP-HPLC en leche entera precalentada a 45°C y presurizada a 150-250 MPa, sin enfriamiento instantáneo. Los resultados se asemejan a los reportados por Scollard *et al.* (2000) con PAPH pues la barorresistencia de ALA fue considerablemente mayor que la exhibida por BLG. Mientras 10, 42 y 56% de BLG se desnaturalizó a 150, 200 y 250 MPa, respectivamente, <10% de ALA lo hizo a todas las presiones probadas; sin embargo, con T_s de 67 - 83.6°C dependiendo de la presión aplicada y un tiempo de retención de ~20 s, resulta complicado distinguir si la causa de la desnaturalización era la presión o el calentamiento relacionado. Datta *et al.* (2005) exploraron la contribución térmica sobre la desnaturalización de

BLG y ALA en leche HAP. ALA no fue desnaturalizada por ninguna de las combinaciones de presión (200 MPa) y temperaturas de entrada (10-50°C), mientras que para BLG, el patrón de desnaturalización por HAP (40% tras HAP con $T_s = 80^\circ\text{C}$) varió en relación al observado para el tratamiento térmico (10% con tratamiento térmico equivalente a 80°C). Por tanto, se concluyó que la desnaturalización de BLG bajo estas condiciones podría deberse a un efecto sinérgico entre temperatura y las fuerzas asociadas con la HAP (cizalla, impactos a alta velocidad, cavitación). Al minimizar el efecto del calentamiento adiabático (tiempo de retención $< 0.7\text{s}$) Pereda *et al.* (2009) no observaron diferencia significativa en la magnitud de desnaturalización de BLG de leche entera HAP a 200-300 MPa con T_i de $30\text{-}40^\circ\text{C}$ (31.5-37.5%), menor que la obtenida con tratamiento térmico a 90°C , 15s (~50%). En cuanto al daño a ALA, no se detectó una diferencia significativa entre el tratamiento térmico y los procesos HAP, con un porcentaje de desnaturalización en el rango de 10-18%. Bouaouina *et al.* (2006) y Graciá-Juliá *et al.* (2008) han analizado los efectos del HAP a presiones en el rango de 200-300 MPa sobre las propiedades de aislado proteicos obteniendo mejoramiento de su funcionalidad (capacidad espumante y emulsificante, viscosidad, etc) aún con cantidades limitadas de agregación proteica por arriba de 225 MPa.

2.3.4.2 Cambios en balance mineral

Se ha observado que diversas operaciones de procesamiento de leche, incluyendo tratamiento térmico, congelación y acidificación, operan cambios en su balance mineral, es decir en la relación entre estados de dispersión (coloidal y soluble) y el grado de ionización de las sales solubles presentes. Por tanto, se han investigado también los efectos del PAP sobre esta razón, principalmente en dos aspectos: distribución entre las fases coloidal y el lactosuero y nivel de minerales ionizados, con énfasis en calcio (Huppertz *et al.*, 2006). Huppertz *et al.* (2002) clasifican al calcio en: *total*, que se refiere a la concentración neta de calcio en la leche; *coloidal*, aquel asociado directamente con moléculas de caseína en ausencia de grupos fosfatos o bien, aquel que forma parte integral del FCC; *difusible* o

soluble, consistente en calcio que forma complejos predominantemente con aniones de fosfato y citrato y el presente en la fase soluble en forma de calcio iónico libre (Ca^{2+}). Diversos autores reportan cambios en la distribución de minerales entre las fases coloidal y difusible (calcio y fosfato predominantemente, pero también magnesio) como consecuencia de la aplicación de alta presión, tanto estática como dinámica (Serra *et al.*, 2009; Zobrist *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 1997; Johnston, 1995); por su parte, el incremento de temperatura que acompaña a los PAPHs tienden a reducir la concentración de calcio en solución (Huppertz *et al.*, 2006).

Se han detectado incrementos moderados en la concentración de Ca^{2+} por efecto del PAPH; sin embargo, los cambios reportados son de magnitud muy variable (Huppertz *et al.*, 2002); este se ha atribuido a una posible reversión entre fases soluble y coloidal durante el almacenamiento. Zobrist *et al.* (2005) observaron incrementos de calcio iónico de ~12% en leche PAPH en comparación con leche cruda, independientemente de la presión aplicada (100-600 MPa). Un efecto colateral del cambio en el balance mineral bajo las condiciones exploradas fue el incremento de pH (≤ 0.09 unidades), causado por el aumento en la concentración de fosfato de calcio soluble. Sin embargo, tras 15 min de almacenamiento a 30°C, los niveles de concentración de Ca^{2+} y pH se redujeron respectivamente hasta -2% y -0.04 unidades con respecto a los valores del control. Por tanto, los cambios reportados dependen también del tiempo de medición post proceso (Schrader *et al.*, 1997). Sin embargo, el almacenamiento refrigerado (4°C) de leche PAPH mantiene los cambios en Ca^{2+} y pH hasta por 48 horas después de presurizada (Zobrist *et al.*, 2005). En cuanto al efecto de presión dinámica sobre los niveles de sales minerales, Zamora *et al.* (2007) observaron incrementos en la concentración de calcio, magnesio y fósforo en suero de leche tras procesos de HAP a 100-130 MPa, en comparación con leche cruda, pasteurizada, pasteurizada y homogeneizada y HAP a 200- 330 MPa; el tratamiento de HAP a 300 MPa provocó una transferencia de minerales de la fase soluble a la micelar. El equilibrio mineral en leche es altamente dependiente de factores como el pH y la temperatura de proceso; se sabe que el calcio iónico se incrementa al reducirse el pH y disminuye con altas temperaturas (On-Nom *et al.*, 2010). Al disminuir el pH, el FCC y una

proporción de Mg asociado a micelas de caseína se disuelven, incrementando la concentración de minerales solubles. Así, las muestras de leche que exhibieron mayor concentración de minerales disueltos eran aquellas con el pH menor (6.5 vs. ~6.7 del resto de las muestras). Por otra parte, Roach y Harte (2008) estudiaron cambios en la concentración del calcio soluble y en la proporción calcio ionizado en leche cruda descremada homogeneizada a 100-350 MPa. La concentración de calcio soluble aumentó 12% y 30% tras HAPs a 250 MPa y 300 MPa, respectivamente, aunque no se detectaron cambios apreciables en la proporción de calcio iónico libre.

2.3.4.3 Cambios en glóbulos grasos

La leche bovina es una emulsión de grasa (~3.6), dispersa en forma de glóbulos con tamaño de partícula variable (0.1- 20 μm) rodeados por una membrana compuesta de fosfolípidos, glicoproteínas, enzimas (p.e. xantioxidasa), lípidos polares, iones y otras sustancias surfactantes (Gallier *et al.*, 2010). La membrana evita la desestabilización coloidal de los glóbulos (floculación, coalescencia) y sirve como barrera física contra la acción de la lipasa, enzima nativa de la leche y responsable de la rancidez hidrolítica (Gervilla *et al.*, 2001). Diversos procesos industriales de leche fluida (agitación durante almacenamiento refrigerado, separación centrífuga, homogeneización convencional) pueden afectar la estabilidad de la membrana del glóbulo graso (MGG), aumentando el riesgo de deterioro lipolítico de la leche. Por tanto, también se ha abordado el estudio del efecto del PAP sobre la integridad del glóbulo graso (GG), principalmente en términos de cambios en tamaño promedio, distribución de tamaño y composición de membrana.

El tamaño promedio y la distribución de tamaños de partícula usualmente se determina por difracción láser (Huppertz *et al.*, 2003). Las medidas más empleadas de dispersión de tamaño globular son $Dv_{0.1}$, $Dv_{0.5}$, $Dv_{0.9}$ (el diámetro debajo del cual se encuentran 10, 50 y 90% del volumen total de partículas, respectivamente), $d_{3,2}$ (diámetro promedio *Sauter*, el diámetro de una esfera que tiene la misma razón volumen/ área superficial que la partícula de interés) y $d_{4,3}$

(diámetro promedio ponderado en volumen). Estos dos últimos son generalmente los más empleados para reportes científicos.

El PAPH <400 MPa y a temperatura ambiente no afecta el tamaño ni la distribución de GG, pero PAPH > 400 MPa incrementa el tamaño promedio del glóbulo y su distribución, sin un daño aparente a la MGG. Por su parte, Ye *et al.* (2004) no detectaron cambios importantes en el tamaño del GG en el rango de presión de 100-800 MPa, pero reportaron interacciones por puentes de disulfuro entre proteínas selectas de MGG con BLG a partir de 100 MPa, y en menor proporción entre κ -caseína y ALA a presiones mayores. Al igual que las interacciones BLG/ κ -caseína, esto puede tener implicaciones tecnológicas de consideración, incluyendo cambios en la velocidad de cremado y modificaciones en diversos parámetros de coagulación. Huppertz *et al.* (2003) tampoco detectaron cambios significativos en el tamaño del glóbulo graso o en la distribución de tamaños tras PAPH's a 200, 400 y 600 MPa por 0-60 min. Los resultados de estas pruebas se comprobaron con observaciones de microscopía óptica donde los glóbulos de grasa de leches presurizadas presentaron diferencias menores en relación a los presentes en leche cruda; sin embargo, durante el almacenamiento refrigerado, las leches presurizadas mostraron una mayor tendencia a formar aglomerados, lo cual podría incrementar la desestabilización coloidal de la leche. Dependiendo de la temperatura de la leche, las características de los glóbulos grasos pueden variar. Se estima que se requiere de una temperatura de 60°C para asegurar que toda la grasa láctea se encuentra en estado líquido; a temperaturas menores, parte de la grasa estará cristalizada, aunque se estima que, desde 40°C, la grasa en estado sólido puede disolverse en la líquida; esta temperatura es la mínima empleada para procesos de homogeneización (Walstra *et al.*, 2006). Gervilla *et al.* (2001) demostraron la influencia de la temperatura sobre las modificaciones en GGs, en leche de oveja tratada por PAPH a 100-500 MPa, 10 min, a 4, 25 y 50°C. La presurización de leche a 25 y 50°C mostró una tendencia a incrementar el tamaño de los glóbulos grasos en el rango de 1-2 μm y a disminuirlo en el rango de 2 a 10 μm . Esta tendencia se revirtió a 4°C. En cuanto a la distribución de tamaño, la presión fue la variable que contribuyó en mayor medida

a las diferencias observadas; en términos generales, las variaciones en la distribución fueron menores a $P < 200$ MPa y mayores a $P > 300$ MPa.

A diferencia del PAPH, la homogeneización afecta el tamaño y la distribución del GG, aún a presiones bajas (Paquin, 1999); se estima, por ejemplo, que a $P = 10$ - 25 MPa, el área interfacial de los GG se incrementa 600%, con 95% de carga proteica compuesta de caseína (Auty, 2011). Además de la presión y temperatura de operación, el tipo de válvula influye decisivamente en estas propiedades (Schultz *et al.*, 2004). En general, el diámetro promedio del glóbulo graso disminuye por efecto de la homogeneización conforme se incrementa la presión aplicada (Cano-Ruiz y Richter, 1997), aunque la magnitud del cambio es fuertemente dependiente de T_i . Asimismo, la distribución de tamaño tiende a desplazarse a valores más pequeños y a reducirse (Dumay *et al.*, 2013). Dado que un elemento condicionante de la eficiencia de la homogeneización es la cantidad de grasa líquida que contiene el GG, la T_i y la presión deben elegirse cuidadosamente para permitir que la leche posea una temperatura superior a 40°C durante el proceso y con ello, una adecuada proporción de grasa en ese estado. Hayes y Kelly (2003b) observaron que la HAP de leche a 50 - 200 MPa, y $T_i = 7^\circ\text{C}$ no presentó una diferencia significativa en efectividad de reducción de tamaño del GG (medido como $d_{4,3}$) al compararse con una homogeneización convencional en dos etapas (18 MPa, 15 MPa + 3 MPa, $T_i = 50^\circ\text{C}$) excepto con 50 MPa, donde el nivel de reducción de tamaño fue mínimo; la mayor reducción se obtuvo a 200 MPa. Para evaluar el efecto del precalentamiento de leche, los mismos autores fijaron una T_i específica para cada nivel de presión de operación (p.e 10°C para 150 MPa, 30°C para 100 MPa) calculada para lograr una T_s constante ($\sim 50^\circ\text{C}$) y así descontar la contribución térmica al proceso; se demostró que la eficiencia de HAP dependía de T_s , pues $d_{4,3}$ se redujo en una magnitud comparable a todas las P de operación, aún a 50 MPa. Thiebaud *et al.* (2003) analizaron el efecto de HAP's ($P = 100$ - 300 MPa; $T_i = 4$ - 24°C) sobre GG de leche entera. A $P < 200$ MPa, $d_{4,3}$ disminuyó al incrementarse P y T_i (hasta 76% y 91% a 100 MPa y 200 MPa, respectivamente); mientras tanto, dos pases a 200 MPa disminuyeron este diámetro hasta $0.2 \mu\text{m}$ ($\sim 95\%$ de reducción) independientemente de T_i , reduciendo también la distribución de tamaño. Sin embargo, todos los tratamientos a 300 MPa presentaron un incremento

en $d_{4,3}$, de mayor magnitud conforme se incrementaba T_i , llegando en algunos casos a sobrepasar el valor de leche cruda. Esto se debió a formación de aglomerados de glóbulos, por mutua absorción de proteínas de MGG; esto hace suponer que existe una P máxima operativa donde se alcanza un límite crítico de reducción de tamaño que, si se excede, propicia un incremento de tamaño globular. Al disociar los aglomerados con SDS se observó que el tamaño individual de GG era tal que representaba un 89-92% de reducción de tamaño. Datta *et al.* (2005) obtuvieron reducciones similares en $d_{4,3}$ (~90%) con 2 pases a 200 MPa, $T_i=10^\circ\text{C}$, sin enfriamiento instantáneo ($T_s=56^\circ\text{C}$); el diámetro del GG disminuyó progresivamente al aumentar T_i hasta 35°C ($T_s=70^\circ\text{C}$) y después no varió significativamente. De aquí se concluye que la proporción de grasa en estado líquido, la cual depende en gran medida de T_i , tiene una influencia decisiva sobre la magnitud de la reducción de $d_{4,3}$ pues su valor mínimo se alcanza con la primer T_s que asegure la licuefacción completa de la grasa durante el proceso HAP. Esta idea se refuerza con los resultados de Hayes *et al.* (2005), donde HAP a $P=150-250$ MPa redujeron el diámetro de GG en forma semejante (91-93%,) dado que con $T_i=45^\circ\text{C}$ y sin enfriamiento instantáneo, T_s excedía 67°C en todos los tratamientos. Picart *et al.* (2006) observaron una disminución en el tamaño y la distribución de GG de leche cruda ($3.31\ \mu\text{m}$, $0.5-10\ \mu\text{m}$) al procesarla por HAP ($T_i=24^\circ\text{C}$) a $P=100-300$ MPa; la distribución pasó de unimodal a bimodal, con máximos a $0.63\ \mu\text{m}$ y $0.16\ \mu\text{m}$, de forma similar a lo reportado por Zamora *et al.* (2012b). Conforme se incrementaba P , el porcentaje del volumen total de GG con diámetro promedio mayor ($0.63\ \mu\text{m}$) disminuía, incrementándose aquellos de menor tamaño ($0.16\ \mu\text{m}$). Paralelamente la distribución se redujo, como pudo observarse al comparar el rango de la mayoría de los GG para HAP a 100 MPa ($0.6\ \mu\text{m} - 8\ \mu\text{m}$) con aquel del proceso a 300 MPa ($0.03\ \mu\text{m} - 1\ \mu\text{m}$).

Algunos estudios se han centrado en la influencia que pueden tener las modificaciones de GG por HAP sobre la vida útil de leche. Como medida de estabilidad coloidal, algunos autores (Pereda *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2005) determinaron la tasa de cremado de leche HAP; dado que este proceso afecta a los cuatro factores que inciden en la reducción de la velocidad de cremado (disminución del tamaño de glóbulo, disminución de la distribución de tamaño,

incremento de densidad de los glóbulos por absorción de proteínas séricas o fragmentos de caseína y reducción de la aglutinación en frío) en ninguna de las muestras analizadas se observó cremado. Mientras tanto, Pereda *et al.* (2008c) analizaron el posible deterioro oxidativo y lipolítico de leche HAP, considerando el incremento en el área superficial relacionado con la disminución del tamaño de GG y el aumento en la actividad de LLP establecido previamente. Al compararse con leche pasteurizada, se detectó un aumento sustancial en la concentración de ácidos grasos libres en leche tratada a 200 MPa ($T_i = 30-40^\circ\text{C}$), mientras que la concentración de productos primarios y secundarios de oxidación se incrementó en leche HAP a 300 MPa; aunque esto puede comprometer la calidad de leche homogeneizada, a la fecha no se han publicado estudios sensoriales descriptivos que puedan confirmar esta aseveración.

Recientemente, Zamora *et al.* (2012a) reportaron diferencias en la composición de la membrana de glóbulo graso entre leche sometida a homogeneización convencional y pasteurización HTST o HAP. En ambos casos, la membrana de los nuevos glóbulos formados estaba, como se esperaba, compuesta en su mayoría por proteínas no nativas de la MGG, pero en el tratamiento convencional se absorbieron fundamentalmente micelas de caseína mientras que en la leche HAP, se encontraron fracciones (α_s , β , κ) de caseína (CN), y nuevos agregados, compuestos en su mayoría de α_s -CN y PS; los fragmentos de CN se pudieron asociar directamente con proteínas nativas de MGG o a través de interacciones de PS que a su vez interactuaron con las proteínas de membrana.

2.3.5 Efectos asociados a cambios en proteínas lácteas

Existe información vasta sobre la influencia del procesamiento sobre la funcionalidad de leche y de proteínas lácteas. Tanto las proteínas como las grasas influyen las propiedades de la leche, pero su capacidad de desarrollar atributos deseables en subproductos lácteos es mayoritariamente afectada por la funcionalidad de las proteínas. Algunas de las propiedades funcionales que han sido exploradas incluyen ópticas (color, turbidez), solubilidad, capacidad de retención de agua, viscosidad, capacidad de gelación, estabilidad térmica,

capacidad de coagulación por renina, capacidad espumante y emulsificante. La funcionalidad proteica está relacionada con su estructura y/o conformación. (Augustin y Udabage, 2007; Ono *et al.*, 1990). Dado que, como se ha mencionado en secciones previas, el PAP puede afectar ambas, su aplicación posibilita el desarrollo de subproductos lácteos con características únicas.

Tratamientos selectos de PAPH y HAP pueden afectar tanto el tamaño promedio como la distribución de tamaño de proteínas lácteas; en consecuencia, su capacidad para dispersar luz disminuye. Los cambios en propiedades ópticas promovidos por el PAP pueden determinarse por diversas técnicas instrumentales, incluyendo turbidimetría y colorimetría triestímulo. En el caso del PAPH, la leche puede observarse temporalmente translúcida, de manera similar al suero (Figura 2.8). Se ha mostrado que su turbidez disminuye al aumentar P en rangos selectos, depende del tiempo de proceso y puede incrementarse como consecuencia de la reagregación de fragmentos de caseína (Orlien *et al.*, 2006). Desobry-Banon *et al.* (1994) reportaron una correlación entre turbidez y reducción en el tamaño de partícula de leche PAPH. Alternativamente, estudios selectos han medido la transmisión luminosa *in situ* como una medida de los cambios en la micela de caseína por efecto de PAPH. De manera general, la transmisión luminosa aumenta con la presión aplicada (P=100-400 MPa), lo cual denota un mayor grado de rompimiento micelar (Huppertz y de Kruiff, 2007). La habilidad de la leche para dispersar luz también se puede medir con el valor de luminosidad L^* , el cual también se asocia con el grado de blancura (Huppertz *et al.*, 2002). Johnston (1995) observa una disminución superior al 20% en L al aplicar $P \leq 300$ MPa ($L=67.3$), pero ningún cambio sustancial a presiones superiores. Resultados similares son reportados por Harte *et al.* (2003) y Gaucheron *et al.* (1997). Esto se atribuye a que la exposición de micelas a $P > 300$ MPa ya no representa una disgregación micelar adicional. Gervilla *et al.* (2001) reportan cambios en los parámetros de color (L^*, a^*, b^*) al presurizar leche de oveja (100-500 MPa) a distintas T_i (4, 25, 50°C) y tiempos de proceso (10, 30 min); se presentaron disminuciones de L^* y a^* (más verde) e incrementos en b^* (más amarillo) al aumentar P. En términos generales la magnitud del cambio neto ΔE aumentó con P y tiempo de proceso y disminuyó al elevar la temperatura. Esto coincide con lo reportado por Considine *et al.* (2008), donde

Antecedentes

tratamientos térmicos revertían la apariencia de leche presurizada al aspecto que presentaban antes del proceso. Por su parte, se requirió $P > 600$ MPa para generar cambios apreciables en luminosidad de leche descremada de búfalo, con una reducción de hasta 16 unidades con respecto al valor de leche cruda (Huppertz *et al.*, 2005); la mayor presión requerida en leche de búfalo para modificar L^* se atribuye a una mayor concentración de FCC, lo cual refuerza la estabilidad de su micela de caseína. Considine *et al.* (2008) indican que la apariencia de leche presurizada puede variar en función de la temperatura de almacenamiento; mientras que a temperaturas de refrigeración (5°C) mantiene su apariencia semitransparente durante periodos prolongados, a temperatura ambiente incrementa progresivamente su luminosidad, aunque sin alcanzar la observada en leche cruda. Igualmente, el efecto del PAPH se puede revertir si la leche presurizada se somete caliente moderadamente (Harte *et al.*, 2003).

Por su parte, variaciones en color de leche HAP están relacionadas con posibles reducciones en el tamaño de glóbulos de grasa, caseína, así como desnaturalización de PS. El color de leche HAP, se ve afectado en diferente magnitud dependiendo de P y T_i . Hayes *et al.* (2003b) reportan cambios en L (+3.5-4 unidades) para leche homogeneizada ($P=18$ MPa) y HAP (100, 150, 200 MPa) con $T_i=10^{\circ}\text{C}$, mientras que a y b no variaron significativamente. Pereda *et al.* (2007) investigaron cambios en color de leche cruda, pasteurizada y HAP a $P=200-300$ MPa y $T_i=30-40^{\circ}\text{C}$. L aumentó (~ 2.5 unidades) para todos los tratamientos HAP en relación a leche cruda, mientras que b disminuyó (1.5-1.8 unidades, que representa una leche menos amarilla) y a varió levemente (+0.09 a -0.4); estos parámetros variaron durante el almacenamiento refrigerado por 21 d. Es importante notar que el cambio más significativo fue nuevamente en el valor de L , lo cual indica que se obtenía una leche más blanca debido al incremento en el número de glóbulos grasos, los cuales difractan la luz más eficientemente. Aunque la blancura fue mayor en leche pasteurizada (93.24) que en las HAP (~ 92.8) y cruda (~ 90.3), estas diferencias no eran visualmente obvias, como ocurre con el PAPH. La mayor magnitud de L en leche pasteurizada se atribuyó a un menor daño en las micelas de caseína, pues HAP puede remover algunas fracciones de la micela de CN, como se expresó con anterioridad.

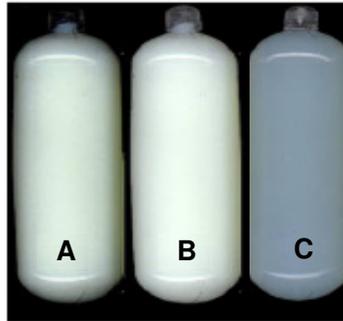


FIGURA 2.8. Cambios en la apariencia de leche tratada térmicamente y presurizada (Considine *et al.*, 2008) A: Leche cruda; B: Leche tratada térmicamente (100°C, 30 min); C: Leche presurizada (600 MPa, 30 min)

Otro de los parámetros afectados por los cambios proteicos inducidos por PAP es la viscosidad. Lopez-Fandiño (2006) establece que tras un PAPH las micelas incrementan su volumen (debido a una mayor capacidad de hidratación) y toman formas irregulares, las cuales poseen mayores volúmenes netos de rotación. Además, Harte *et al.* (2003) consideran también que fracciones separadas de la micela de caseína por efecto del PAPH ligan parte del suero en donde se encontraban previamente dispersas. Estos dos factores se consideran pueden contribuir al aumento de viscosidad en la leche presurizada. Por ejemplo, Huppertz *et al.* (2003) determinaron los cambios en viscosidad relativa de leche descremada y procesada a 200-600 MPa/20°C por 0-60 min. La viscosidad relativa se incrementó con la P y en menor magnitud con el tiempo de proceso. Por otra parte, la viscosidad también puede verse afectada por HAP, considerando los cambios en tamaño de partícula, la desnaturalización de PS y la formación de agregados entre micelas de CN (o fragmentos de éstas) y PS. En comparación con leche cruda, Pereda *et al.* (2007) observaron una reducción en la viscosidad de leche HAP con $T_i=30$, 40°C cuando $P=200$ MPa por reducción en el tamaño del GG; sin embargo, tratamientos más intensos ($P=300$ MPa) aumentaron la viscosidad hasta niveles similares o mayores a los de leche cruda debido a la posible formación de agregados de GGs compartiendo componentes proteicos adsorbidos en su superficie; esta hipótesis, propuesta previamente (Thiebaud *et al.*, 2003) se confirmó a través del incremento en $D_{4,3}$ de GGs de leche HAP a 300 MPa, cuya magnitud no varió significativamente con relación a la reportada para leche cruda.

2.3.6 Cambios en atributos sensoriales

La leche posee un sabor neutro, ligeramente dulce y sin un resabio definitivo; este atributo es crítico para la aceptabilidad del producto fluido y base para obtener derivados lácteos de alta calidad. Las variaciones en el sabor de leche cruda se atribuyen a cambios en su composición (a su vez generados por el tipo de alimentación, etapa de lactancia, raza, época del año, etc.). El sabor de la leche puede modificarse tras el ordeño por diversos factores, agrupados como absorbidos del ambiente (provenientes del alimento balanceado o de desechos de la vaca), transmitidos desde el organismo (generalmente del rumen o de los pulmones de la vaca), de origen bacteriano por malas prácticas higiénicas y/o crecimiento de psicrótrofos durante el almacenamiento refrigerado o química por contacto con soluciones sanitizantes, oxidación por luz, sobre-tratamiento térmico, etc. (Álvarez, 2009). Ciertas notas pueden ser perceptibles aún a concentraciones tan bajas como ng/L.

Gran parte de los componentes de leche pueden afectarse fisicoquímicamente cuando ésta se trata térmicamente para su conservación. La magnitud de los cambios está en función de la termorresistencia de los componentes individuales y de la intensidad del proceso. La sensibilidad en orden descendente es: enzimas libres, PS, enzimas ligadas a otros componentes, micelas de caseína, lactosa y triglicéridos. En cuanto a los tratamientos, aquellos de baja intensidad como termización y pasteurizaciones LTLT y HTST producen cambios mínimos, mientras que las modificaciones por esterilizaciones comerciales (enlatado, UHT) son pronunciadas. El sabor a cocido descrito con regularidad en leche UHT proviene del desarrollo de derivados sulfurados de BLG, como ácido sulfhídrico y la formación de pequeñas concentraciones de sulfuros libres y mercaptanos (Kim *et al.*, 1984). Una menor dependencia del calor como factor de conservación reduciría la aparición de sabores de este tipo y con ello, se podría mejorar la aceptabilidad sensorial de leche o bien, ofertar productos de valor agregado. Ese es el razonamiento detrás de la implementación de procesos no térmicos como el PAP. Una posible limitante para lograr este objetivo radica en la reducida inactivación enzimática a T_i baja, dado que, como se mencionó

anteriormente, se requiere de una contribución térmica importante para disminuir la actividad de enzimas hidrolíticas de leche. Por ejemplo, Garcíasco *et al.* (2000) reportaron una reducción en proteólisis en leche tratada por PAPH a 400 MPa, 15 min, y relacionaron esto con el mantenimiento de las características sensoriales de la leche durante el almacenamiento refrigerado, aunque esto sólo se logró cuando $T_i > 40^\circ\text{C}$. En tratamientos térmicos asistidos por PAPH, Vázquez-Landaverde *et al.* (2007) reportan un efecto inhibitorio sobre la formación de compuestos asociados con sabor a cocido. Sin embargo, a la fecha, y en el mejor entendimiento, no se ha realizado un estudio sensorial completo de las posibles implicaciones de la aplicación de PAP en la calidad sensorial de leche bovina tras su aplicación y durante su almacenamiento refrigerado. Por otra parte, la posible influencia de HAP sobre el perfil de sabor y flavor de leche, se ha explorado a través de estudios de formación de compuestos volátiles (Pereda *et al.*, 2008a), de actividades proteolítica (Pereda *et al.*, 2008b) y lipolítica remanentes (Pereda *et al.*, 2008c), y de formación de compuestos indicadores de daño térmico (Pereda *et al.*, 2009), aunque sin realizar un estudio sensorial descriptivo en forma. El perfil de los compuestos volátiles, extraídos por microextracción en fase sólida (SPME) e identificados por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC/MS), en leche HAP a 200 y 300 MPa y $T_i=30, 40^\circ\text{C}$ en comparación con leche ultrapasteurizada (UHT) y sobrepasteurizada (90°C , 15s) incluyó aldehídos, cetonas hidrocarburos, ácido hexanoico, limoneno y disulfuro de metilo. En términos generales, los resultados indicaron que la formación de compuestos volátiles relacionados con defectos de sabor (por alta temperatura, por oxidación) fue menor en leche HAP en comparación con las leches UHT y sobrepasteurizada y por tanto, puede representar una alternativa viable desde el punto de vista sensorial (Pereda *et al.*, 2008c; Pereda *et al.*, 2009). De igual forma, leche tratada en idénticas condiciones de HAP produjo incrementos en lipólisis (medida como ácidos grasos libres) y proteólisis a 200 MPa, 40°C y en oxidación (medida como concentración de hexanal) a 300 MPa durante su almacenamiento refrigerado con respecto a leche tratada térmicamente (Pereda *et al.*, 2008b,c); sin embargo, nuevamente no se llevaron a cabo pruebas sensoriales que corroboraran si las mayores concentraciones de estas sustancias podían ser percibidas por consumidores y/o miembros de un panel entrenado.

2.3.7 Efecto sobre propiedades de elaboración de queso

El queso es el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, en el que la proporción entre proteínas de suero y caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

- a) coagulación total o parcial de leche (o leche descremada, parcialmente descremada, crema) a través de la acción de renina u otra agente coagulante apropiado y por el drenado parcial del suero resultante de dicha coagulación, o
- b) por técnicas de elaboración que involucren a la coagulación de proteína de leche y/o de productos obtenidos de leche, que dan un producto final con características fisicoquímicas y sensoriales similares a las obtenidas por el procedimiento descrito en a) (WHO/FAO, 2011).

Existen diversas clasificaciones de quesos, aunque uno de los criterios principales es la textura: muy duros, duros, semiduros, semisuaves y suaves (Fox y McSweeney, 2004). A pesar de la enorme variedad de quesos a nivel mundial (alrededor de 1,400), los principios y protocolos básicos para producir queso con características deseables son comunes: a) emplear buenas prácticas de manufactura y utilizar leche de alta calidad (de composición consistente y de vacas sanas y con baja carga microbiana) ayuda a producir queso de composición consistente; b) controlar la tasa y el grado de desarrollo de ácido en pasos específicos del procedimiento permite obtener quesos con atributos físicos deseables; c) prevenir la contaminación de microorganismos indeseables y evitar abusos de temperatura y exposición a luz evitará problemas durante el almacenamiento y distribución (Johnson y Lucey, 2006).

La leche puede coagularse por medios enzimáticos, químicos (uso de ácidos orgánicos), térmicos o combinaciones de éstos; para la elaboración de queso, el método más empleado es el enzimático. La coagulación de leche por este método se lleva a cabo en dos etapas: la primera, denominada *enzimática*, consiste en la modificación de las micelas de caseína por proteólisis limitada, inducida por renina; la fracción hidrolizada es la κ -CN, produciendo para- κ -CN y caseinomacropéptidos (López-Fandiño *et al.*, 2006); la segunda etapa se conoce como no enzimática y se

caracteriza por una agregación de las micelas modificadas, donde el calcio juega un papel determinante (Fox y McSweeney, 1998). Se sabe que los tratamientos térmicos como la pasteurización afectan la agregación de leche, aumentando el tiempo de coagulación y disminuyendo la sinéresis, lo cual a su vez resulta en un incremento en el rendimiento y una reducción en la firmeza de la cuajada (Singh y Waungana, 2001). Como se explicó anteriormente, tanto PAPH como HAP provocan cambios importantes en los componentes de leche presurizada, incluyendo modificaciones en el tamaño micelar, solubilización de FCC y desnaturalización de proteínas séricas, las cuales en su mayoría terminan asociándose con caseínas. Todos estos factores en conjunto afectan diversos parámetros asociados con la coagulación, incluyendo tiempo de coagulación por renina (TCR), velocidad de coagulación, capacidad de retención de agua (CRA), firmeza del gel (FG), etc. (Huppertz *et al.*, 2006). Desobry-Banon *et al.* (1994) distinguen tres etapas del TCR en leche PAPH a 0-670 MPa, por 22 min a 20°C; primero, sin cambios aparentes en TCR de leche PAPH hasta 150 MPa, en relación al observado con leche cruda (145 s); después, una disminución rápida del TCR hasta 230 MPa (122 s), con reducciones de menor magnitud hasta 670 MPa (112 s). Sin embargo, investigaciones posteriores reportan un comportamiento diferenciado del TCR en relación con la presión aplicada; PAPH's por debajo de 200-300 MPa reducen el TCR, mientras que a presiones mayores el TCR se incrementa hasta alcanzar valores similares a los de leche cruda al presurizarse a 400 MPa (Zobrist, 2005; Arias *et al.*, 2000; Needs *et al.*, 2000; López-Fandiño *et al.*, 1997); al aumentar la presión por encima de 400 MPa, el TCR se incrementa por encima del control (Zobrist, 2005). Las reducciones en TCR se han relacionado con la ruptura de micelas de caseína o la disminución en la cantidad de κ -caseína en la superficie micelar; mientras tanto, los incrementos de TCR a presiones por encima de 200-300 MPa se asocian con un aumento de las interacciones entre BLG desnaturalizada y κ -CN, con la consecuente disminución en la velocidad de hidrólisis enzimática de esta última por impedimento estérico (Needs *et al.*, 2000). López-Fandino *et al.* (1997) encontraron reducciones en la liberación de caseinmacropéptido al presurizar leche por encima de 200 MPa, indicando una disminución en la tasa de hidrólisis de κ -CN. La temperatura de proceso también es un factor de relevancia. López-Fandiño y Olano (1998) determinaron TCR y FG

Antecedentes

de leche presurizada a 100-400 MPa a diferentes T_i (25-60°C). El uso de temperaturas de proceso por encima de 40°C afectó negativamente la coagulación enzimática, alargando el TCR y disminuyendo la FG; la aplicación de tratamientos térmicos moderados y alta presión incrementó la desnaturalización de BLG en comparación con el PAPH efectuado a temperatura ambiente. Resultados similares fueron obtenidos por San Martín- González *et al.* (2007), pues el gel formado con leche presurizada a 483 MPa/30°C fue marcadamente más débil y su TCR casi se duplicó en relación al PAPH a la misma presión, pero con $T_i = 10^\circ\text{C}$; mientras tanto, temperaturas de proceso por encima de 40°C inhibieron completamente la formación de gel. Zobrist *et al.* (2005) determinaron también la influencia del tiempo y temperatura de almacenamiento de leche presurizada a 100-600 MPa sobre los parámetros de coagulación. El almacenamiento refrigerado (4-5°C) hasta por 48 h no alteró el TCR de leche cruda o PAPH. Sin embargo, un incremento gradual del TCR se observó en todas las leches presurizadas y posteriormente mantenidas a 20°C por 48 h, hasta alcanzar valores similares a los de leche cruda ($P=100$ MPa) o significativamente más altos ($P=250, 400, 600$ MPa) al mismo tiempo de almacenamiento. Este fenómeno se atribuyó a la reconstitución de las micelas de caseína a esta temperatura, con la reintegración de kCN a la superficie de las micelas reformadas, lo cual, como ha sido reportado previamente (Huppertz *et al.*, 2004b,c) no ocurre a 5°C.

La FG durante la coagulación se ve influenciada por PAPH, principalmente por la P de operación y la tasa de liberación de presión (Devi *et al.*, 2013). Zobrist *et al.* (2005) detectaron que el rompimiento micelar incrementa FG, mientras que la formación de interacciones caseína-BLG la reduce. Sin embargo, el hecho que todos los geles de leche PAPH por 30 min fueron más firmes que los de leche cruda, independientemente de la presión utilizada (100, 250, 400 o 600 MPa) sugiere que el rompimiento micelar tiene un mayor efecto en la formación del coágulo que la asociación BLG-KCN. Huppertz *et al.* (2005) evaluaron el efecto del PAPH (100-600 MPa, 0-30 min, 20°C) sobre leche previamente termoprocesada (90°C, 10 min); es bien sabido que la leche sobreprocesada térmicamente no puede formar al corte coágulos enzimáticos lo suficientemente firmes sin generar pérdidas extensivas de cuajada. Los resultados de este trabajo muestran que el control y la leche

termoprocésada y presurizada a 100 MPa no eran coagulables por renina, pero los tratados a 250-600 MPa exhibían TCR's de la misma magnitud o menores a los de leche cruda; el TCR disminuía con incrementos de P o tiempo de proceso. Mientras tanto, FG aumentó considerablemente para leche termoprocésada y presurizada a 250-600 MPa por 30 min o a 400-600 MPa por 0 min (despresurización inmediata).

Una de las aplicaciones más interesantes del PAPH en leche para quesería es el incremento en rendimiento (San Martín-González *et al.*, 2006), pues un aumento del 0.5% representa ganancias interesantes para la industria láctea (San Martín-González *et al.*, 2007). Los estudios sobre este t3pico pueden clasificarse como indirectos, aquellos que estiman el rendimiento por centrifugaci3n de geles enzimáticos (a trav3s de la medici3n de CRA), o directos, aquellos que determinan el rendimiento a partir de la cantidad de queso obtenida por unidad de peso de leche utilizada (Buffa, 2003). En el primer caso, L3pez-Fandiño *et al.* (1996) estimaron aumentos en el rendimiento de 14 y 20% para queso elaborado con leche presurizada por 30 min a 300 y 400 MPa, respectivamente. En ambos procesos, reducciones en el contenido de prote3na en el suero (7.5 y 15%, respectivamente), incremento en la desnaturalizaci3n de BLG, disminuci3n del volumen de suero obtenido (menor sin3resis) y una mayor CRA llevan a suponer la incorporaci3n de cantidades importantes de BLG y agua al queso, lo cual explica el mayor rendimiento obtenido. Resultados similares fueron obtenidos por Needs *et al.* (2000) y Huppertz *et al.* (2004e); en el primer trabajo se reporta la disminuci3n del 30% de prote3nas en suero de leche PAPH a 600 MPa en relaci3n con leche cruda, por incorporaci3n a la cuajada. Por su parte, Huppertz *et al.* (2004e) no encontraron cambios significativos en propiedades de quesería a 250 MPa/20°C/0-60 min en relaci3n con leche cruda. Sin embargo, con procesos a 400 y 600 MPa/20°C por 30 min se detectaron incrementos en el rendimiento del 16% y 24% respectivamente, aumento en la humedad en la cuajada y disminuciones en el porcentaje de prote3na remanente en el suero con PAPH (hasta +5% y -36%, respectivamente, para el PAPH a 600 MPa). M3s del 90% de BLG se hab3a desnaturalizado a 400 MPa, mientras que 20 y 60 de ALA lo hab3a hecho hasta 600 y 800 MPa, respectivamente. Sin embargo, la incorporaci3n de prote3na s3rica desnaturalizada no explica en si misma el incremento de rendimiento; en apariencia, los cambios en la matriz de la

Antecedentes

cuajada propician una absorción más eficiente de agua. Los efectos del PAPH se vieron acentuados si la leche presurizada se almacenaba a 4°C por 24 h. El rendimiento se incrementó en 5-10% en relación al obtenido con leche no almacenada, a pesar que el porcentaje de proteína en el suero aumentó levemente. En términos generales, estos autores sugieren un PAPH de 400 MPa, 10-15 min como el óptimo para mejorar las características de leche para quesería; bajo estos parámetros se pueden lograr incrementos de aprox. 10% de rendimiento, sin alterar de manera importante la cantidad de agua en la cuajada (con la aceleración de reacciones deteriorativas que esto conlleva), permitiendo la incorporación de proteínas séricas, reduciendo el TCR y aumentando la FG.

De manera similar a PAPH, HAP tiene el potencial de afectar las propiedades de coagulación de leche. Las modificaciones en la leche provocadas por HAP (disminución de glóbulos de grasa, modificación de proteínas, inactivación enzimática, solubilización del calcio) pueden tener efectos sobre las propiedades de elaboración de queso. Aún la homogeneización convencional de leche para quesería genera problemas potenciales para la inmensa mayoría de los quesos, pues el coágulo resultante tiende a ser débil, con el consecuente resquebrajamiento y pérdidas de cuajada; la liberación de suero durante la elaboración es lenta y la maduración genera problemas sensoriales de diversa índole; por tanto, su aplicación generalmente se limita a quesos suaves no madurados (Thomann *et al.*, 2008). Además, el uso de tratamientos térmicos más intensos que la pasteurización (como algunas veces ocurre con el calentamiento inherente a la HAP) provocan cambios en la leche que redundan en efectos análogos a los descritos para la homogeneización (Zamora *et al.*, 2007). Estas modificaciones adversas en los parámetros de elaboración de queso se relacionan con mayores contenidos de humedad en la cuajada, por lo que, a pesar de los problemas asociados, la aplicación de homogeneización o temperaturas elevadas en leche resulta ser un tema de considerable interés para la industria láctea, por el ya mencionado posible incremento en rendimiento. Hayes y Kelly (2003a), obtuvieron resultados diferentes a lo esperado, pues el tiempo de gelificación disminuyó, y la FG tras 2400 s de adición de cuajada aumentó con el incremento de presión en una HAP (P=50-200 MPa) y no exhibió cambios importantes con la aplicación de la presión en una o dos

etapas, excepto para la leche tratada a 200 MPa, donde con el uso de dos etapas se obtuvo el menor tiempo de gelificación y la máxima FG de todas las pruebas realizadas. Zamora *et al.* (2007) determinaron TCR, FG a los 30 min, velocidad de firmeza de cuajada (VFC), rendimiento, porcentaje de nitrógeno en el suero y porcentaje de humedad de la cuajada de leche HAP a 100, 200, 300 MPa en una o dos etapas, con la segunda etapa operando a 30 MPa. Para los tratamientos de una etapa, el TCR disminuyó con el proceso a 100 MPa, pero fue incrementándose al aumentar la presión, hasta que a 300 MPa el TCR era muy similar al de leche cruda. Igualmente, VFC y FG disminuyeron con HAP=100 MPa, pero se incrementaron al aumentar la presión a 200 y 300 MPa, sobrepasando incluso los valores obtenidos con leche cruda. Todos los parámetros de coagulación en los HAP's de dos etapas resultaron menores o similares que en los de una etapa. Por tanto, los tratamientos a 200 y 300 MPa de una etapa resultaron poseer propiedades adecuadas de elaboración de queso, incluso mejores que las observadas con leche cruda. Esta idea se refuerza considerando que el rendimiento de la cuajada aumentó de 21.38% para leche cruda a 31.47% y 35.35% para HAP a 200 y 300 MPa, lo cual se puede explicar primordialmente por el incremento en contenido de humedad (64.76, 74.35 y 76.42% respectivamente) y por la incorporación de proteínas de suero a la cuajada, basándose en la reducción progresiva del contenido de nitrógeno en el suero de leche (de 0.143 % en leche cruda a 0.112% en leche HAP a 300 MPa). Se ha demostrado que las interacciones entre CN y PS son mayoritariamente hidrofóbicas, con una inhibición prácticamente completa de formación de puentes de hidrógeno (Zamora *et al.*, 2012c) Las proteínas de suero, como se vió anteriormente, son altamente higroscópicas. La mayor incorporación de proteínas de suero también puede explicar el incremento del TCR en HAP>200 MPa, por la formación previamente descrita de complejos BLG-KCN. La reducción del TCR en HAP<130 MPa, puede explicarse en términos de la remoción parcial de KCN, propuesta por Sandra y Dalgleish (2007) o bien, porque eran las muestras con mayor contenido de calcio soluble. Finalmente, la estructura más firme (mayor FG) y la mayor VFC (a mayor VFC, menor tiempo requerido para que la cuajada llegue a un grado adecuado de firmeza para el corte) en los coágulos de leche HAP a 200 y 300 MPa puede explicarse en términos de la mayor cantidad de proteína o bien debido a la inclusión de diminutos glóbulos de

grasa dentro de la estructura del gel. Como se mencionó con anterioridad, la HAP propicia la reducción de los glóbulos de grasa a una fracción de su tamaño original. Los nuevos glóbulos son estabilizados por la absorción de proteínas séricas o fragmentos de caseína en la membrana (Sandra y Dalgleish, 2005), de tal suerte que pueden comportarse como si fueran micelas y formar parte integral del gel, en lugar de ser glóbulos de grasa embebidos en la estructura. Empleando los mismos parámetros que el estudio de Zamora *et al* (2007), Serra *et al.* (2007) determinaron la adecuación de la leche HAP para la elaboración de yogurt. Al someterse a coagulación ácida, la leche HAP a 200 y 300 MPa mostró mayor FG y menos sinéresis y acidez titulable que leche tratada térmicamente y fortificada con 3% de leche en polvo.

2.3.8 Uso como pretratamiento para elaboración de queso

A la fecha, hay numerosos reportes del uso de PAP estática y dinámica para el mejoramiento de características funcionales, tecnológicas y parámetros de calidad de quesos frescos y madurados, incluido el ya citado incremento en rendimiento. Estos cambios, sin embargo, pueden verse acompañados de modificaciones en la microestructura, textura y características sensoriales y funcionales del queso. Múltiples características de la leche PAP ya mencionadas a lo largo de esta revisión se conjugan para crear estas diferencias: reducción de la microflora nativa de leche, resistencia de enzimas selectas a la alta presión (como LLP), desnaturalización de proteínas séricas, etc. Por otra parte, los cambios composicionales (mayor humedad, mayor proteína) y estructurales de la cuajada juegan un papel determinante en el desarrollo de estos atributos (Trujillo *et al.*, 2000). Los parámetros texturales del queso parecen ser de los más afectados por el PAPH y, por tanto, son de los más estudiados. Estas modificaciones pueden verse como un problema, dado que la textura de los quesos elaborados con leche PAPH con frecuencia no se asemeja a los controles; por otra parte, puede visualizarse como un área de oportunidad para el desarrollo de productos con características texturales únicas.

Antecedentes

San Martín-González *et al.* (2007) obtuvieron rendimientos de 11.40 y 11.54% en queso *cheddar* elaborado con leche PAPH a 676 MPa/10°C y 483MPa/30°C, lo cual representa un incremento del 11.8 y 10.5% sobre el rendimiento de quesos elaborados con leche cruda. Drake *et al.* (1997) lograron incrementar aprox. 7% el rendimiento de queso *cheddar* mediante un PAPH 586 MPa, 3 min (3 ciclos de 1 min). Tras tres meses de almacenamiento y empleando pruebas sensoriales, Drake *et al.* (1997) definieron atributos texturales diferentes en queso *cheddar* de leche presurizada (pastoso, blando) comparado contra quesos de leche cruda y pasteurizada (*acorchado*, atributo típico de quesos jóvenes), los cuales obtuvieron calificaciones significativamente más altas. Sandra *et al.* (2005) analizaron instrumental (análisis de perfil de textura y pruebas de compresión) y sensorialmente (análisis descriptivo) quesos frescos de leche cruda, quesos de leche cruda tratados con alta presión y quesos elaborados con leche presurizada (400 MPa, 20 min, 20°C). La textura de estos últimos resultó ser completamente diferente a la de los dos primeros quesos, tanto al día 1 como tras 8 días de almacenamiento refrigerado, durante el cual fueron los únicos en exhibir cambios, presentando una pérdida considerable de firmeza, elasticidad y capacidad de desmoronarse. En general, las diferencias texturales observadas entre estos pueden atribuirse al contenido de humedad incrementado y a la estructura más propensa a la proteólisis que exhiben los elaborados con leche presurizada (Buffa *et al.*, 2003). De manera contraria a lo que sugieren las pruebas de textura, estudios con microscopía electrónica han detectado que la microestructura de los quesos presurizados es más similar a los quesos de leche cruda que los quesos de leche pasteurizada (Buffa *et al.*, 2001b; Drake *et al.*, 1997). La influencia del PAPH sobre otros atributos de quesos han sido explorados, incluyendo color (Sandra *et al.*, 2005), perfiles de compuestos derivados de proteólisis (Buffa *et al.*, 2003; Trujillo *et al.*, 2000), flavor (Drake *et al.*, 1997), propiedades viscoelásticas (San Martín-González *et al.*, 2007), entre otras. Dado que estos atributos son de mayor relevancia para quesos madurados y no para frescos, no serán analizados a profundidad en esta revisión.

Los reportes sobre HAP en leche para quesería y sus efectos sobre las características del queso, son contados. Trabajos con quesos regionales italianos,

como los reportados por Guerzoni *et al.* (1999), Lanciotti *et al.* (2004) y Lanciotti *et al.* (2006) se basan en la eliminación selectiva de flora microbiana nativa de leche, pues emplean una presión de operación en el límite inferior de PAP (100 MPa) y no pueden asegurar la eliminación completa de microorganismos patógenos (Vachon *et al.*, 2002), así que el proceso implementado se asemeja más a una termización. En términos generales, estos tres trabajos reportan incremento de rendimiento y reducción de sinéresis (de manera análoga a como ha sido observado con pretratamientos de homogeneización convencional de leche para elaboración de quesos), así como cambios en ecología microbiana y en los perfiles de maduración (proteólisis, lipólisis), con un incremento en la aceptabilidad sensorial con respecto a aquellos elaborados con leche pasteurizada. Van Hekken *et al.* (2007) y *et al.* (2000) estudiaron las características de queso mozzarella elaborado con leche microfluidizada (34-172 MPa), con $T_i=10-54^{\circ}\text{C}$; la microfluidización redujo la CRA del queso y alteró el desarrollo de microestructura; el tamaño de GG en la cuajada se redujeron al aumentar la P y T_i ; sin embargo únicamente aquellos elaborados con leche microfluidizada a $T_i=10^{\circ}\text{C}$ presentaron cuajadas bien fusionadas, capaces de formar hebra durante el cocimiento; el resto de los quesos presentaba cuajadas cortas, más firmes y menos cohesivas, con baja capacidad de fundido. Kheadr *et al.*, (2002) por su parte, reportan cambios en la flora microbiana nativa de leche bovina tratada con 5 ciclos de 1 min de HAP a 200 MPa. Aunque el rendimiento de los quesos HAP fue mayor que el de aquellos elaborados con leche HTST (11.65 vs 11.15%) y sus parámetros texturales fueron mejores (quesos más firmes, elásticos, cohesivos, menos quebradizos), la reducción microbiana obtenida por HAP fue de 2-4 \log_{10} , dependiendo de la proporción de grasa en leche (0-3%) por lo que el tratamiento aplicado no podía equipararse a una pasteurización. Escobar *et al.* (2011) estudiaron el efecto de HAP (100-300 MPa) y de pasteurización LTLT asistida por HAP sobre leche empleada para elaborar queso *fresco* (coagulado por ácido); se vislumbró que el proceso mixto a 300 MPa fue el más adecuado para la producción de esta variedad de queso, dado que creó una matriz proteica abierta, compuesta de fragmentos de caseína y PS desnaturalizadas que retuvo una mayor proporción de suero, incrementó sustancialmente el rendimiento (14.2%), en comparación con todos los demás quesos evaluados, especialmente con aquellos elaborados con leche cruda tratada

a la misma P (11.8%) y pasteurizada LTLT (11.2%) y produjo las mejores características sensoriales (menos firmes, más desmoronables). Por su parte, Zamora *et al.* (2012a) reportan el efecto de HAP (300 MPa, 30°C) de leche sobre el proceso de elaboración y la vida de anaquel de un queso fresco (sin adición de cultivo iniciador) coagulado enzimáticamente, lo cual se semeja al producto propuesto en el presente trabajo. Aunque la calidad microbiológica (sin presencia de hongos y levaduras) y, en consecuencia, la vida útil, fue superior para los quesos HAP que para los pasteurizados (80°C, 15s) y la sinéresis durante el almacenamiento refrigerado se redujo, se presentaron diversos problemas tecnológicos durante la elaboración del queso HAP, en particular durante la coagulación y el corte, debido a una cuajada mal fusionada, con tendencia a desmoronarse y en consecuencia, difícil de cortar. El TCR se redujo, lo cual se atribuyó a una mayor disponibilidad de KCN para hidrolizarse, por la antes descrita disociación parcial que sufre y por absorción en la superficie de los GG recién formados; este efecto influyó en mayor medida que una posible formación de complejo KCN-BLG, que se sabe aumenta el TCR en leche tratada térmicamente (Singh y Waungana, 2001).

2.4 Justificación y objetivos del proyecto

La aplicación de HAP como pretratamiento de leche para elaboración de quesos ha sido explorada en diversos trabajos; sin embargo, contadas investigaciones han reportado una reducción de carga microbiana inicial en leche por HAP equiparable a una pasteurización desde el punto de vista de reducción de carga microbiana; este requisito es indispensable para elaborar quesos frescos, pues su alto pH y alto contenido de humedad lo hacen altamente susceptible al crecimiento de patógenos (Clark *et al.*, 2001). A la fecha, se sabe que HAP a 300 MPa se considera un tratamiento adecuado para lograr este objetivo, aunque recientemente se probó que este nivel de presión no resulta adecuado para elaborar quesos frescos (Zamora *et al.*, 2012b); se presume entonces que un nivel comparable de reducción de carga microbiana puede alcanzarse a $P < 300$ MPa incrementando la T_i o el número de pases de HAP; sin embargo, al aumentar la

Antecedentes

contribución térmica al proceso de conservación, se corre el riesgo de modificar negativamente las propiedades microestructurales y, en consecuencia, las características tecnológicas de la leche para elaborar un queso de este tipo. La aplicación de pases múltiples de HAP a Ti bajas (<30°C) no ha sido explorada aún y constituye un área de oportunidad. Por otra parte, no hay evidencia de estudios sensoriales descriptivos con leche HAP y quesos elaborados con ella han sido evaluados, pero sólo en sus propiedades texturales (Escobar *et al.*, 2011). No se conocen estudios publicados sobre posibles cambios en el perfil de sabor de quesos elaborados con leche HAP bajo condiciones que garanticen la inocuidad del producto terminado.

Basándose en esta evidencia, se plantea una hipótesis de trabajo y los siguientes objetivos general y específicos:

Hipótesis

Se pueden definir tratamientos de pases múltiples de HAP que garanticen la inocuidad microbiológica de leche entera bovina y permitan mejorar sus propiedades tecnológicas para la elaboración de un queso fresco, sin alterar las características fisicoquímicas y atributos sensoriales de éstos últimos.

Objetivo general:

Evaluar los cambios microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales de leche entera bovina sometida a tratamientos selectos de HAP equivalentes desde el punto de vista microbiológico a una pasteurización térmica, así como la influencia de estos cambios en la elaboración y las características de queso panela.

Objetivos específicos:

- Establecer condiciones de procesamiento de leche entera por HAP que sean equivalentes desde el punto de vista microbiológico a una pasteurización térmica a alta temperatura y corto tiempo (HTST)

Antecedentes

- Comparar la influencia de HAP's vs HTST sobre propiedades fisicoquímicas específicas de leche entera.
- Comparar las características fisicoquímicas y tecnológicas de quesos panela elaborados con leche HAP o HTST durante su manufactura y almacenamiento refrigerado.
- Evaluar las características sensoriales de leche HAP vs leche HTST y quesos HAP y HTST mediante pruebas descriptivas.

3 METODOLOGÍA

3.1 Plan de investigación

De acuerdo a los objetivos descritos, se planteó el siguiente plan de investigación, dividido en cinco etapas. En la Figura 3.1 se presenta un resumen gráfico, el cual se describe detalladamente a continuación.

3.1.1 Etapa 1: Evaluación preliminar de presión de operación y temperatura de entrada en procesos HAP

Para establecer los parámetros de HAP a utilizarse en pruebas posteriores se realizaron pruebas exploratorias con leche entera cruda (3% grasa) Se buscaron definir los valores de P, Ti y número de pases de alta presión de homogeneización de leche entera bovina (3% grasa); se seleccionaron las magnitudes de estos factores buscando maximizar la inactivación microbiana en leche (medida como reducción de cuentas de bacterias mesófilas aerobias nativas) sin alterar de manera importante su capacidad tecnológica para elaborar queso panela (textura, rendimiento). Para ello, se realizaron dos series de experimentos independientes; en el primero, se procesó leche bovina a diferentes condiciones de P y Ti y se evaluó la reducción de BMA's y el rendimiento de quesos panela al día 1 de elaboración y su evolución durante el almacenamiento refrigerado mediante una evaluación sensorial informal. En el segundo, se procesó leche con 1 ó 3 pases de P a 250 MPa y $T_i=20, 40^{\circ}\text{C}$. Los factores de proceso se eligieron de acuerdo a reportes previos empleando el mismo modelo de homogeneizador disponible para este proyecto. Los límites de las presiones de operación se eligieron por ser, respectivamente, el límite superior de homogeneización comercial y la presión máxima que alcanza el equipo sin presentar fluctuaciones de presión mayores a ± 15 MPa. Se realizaron experimentos por duplicado para el primer grupo de experimentos y un solo experimento para el segundo.

Metodología

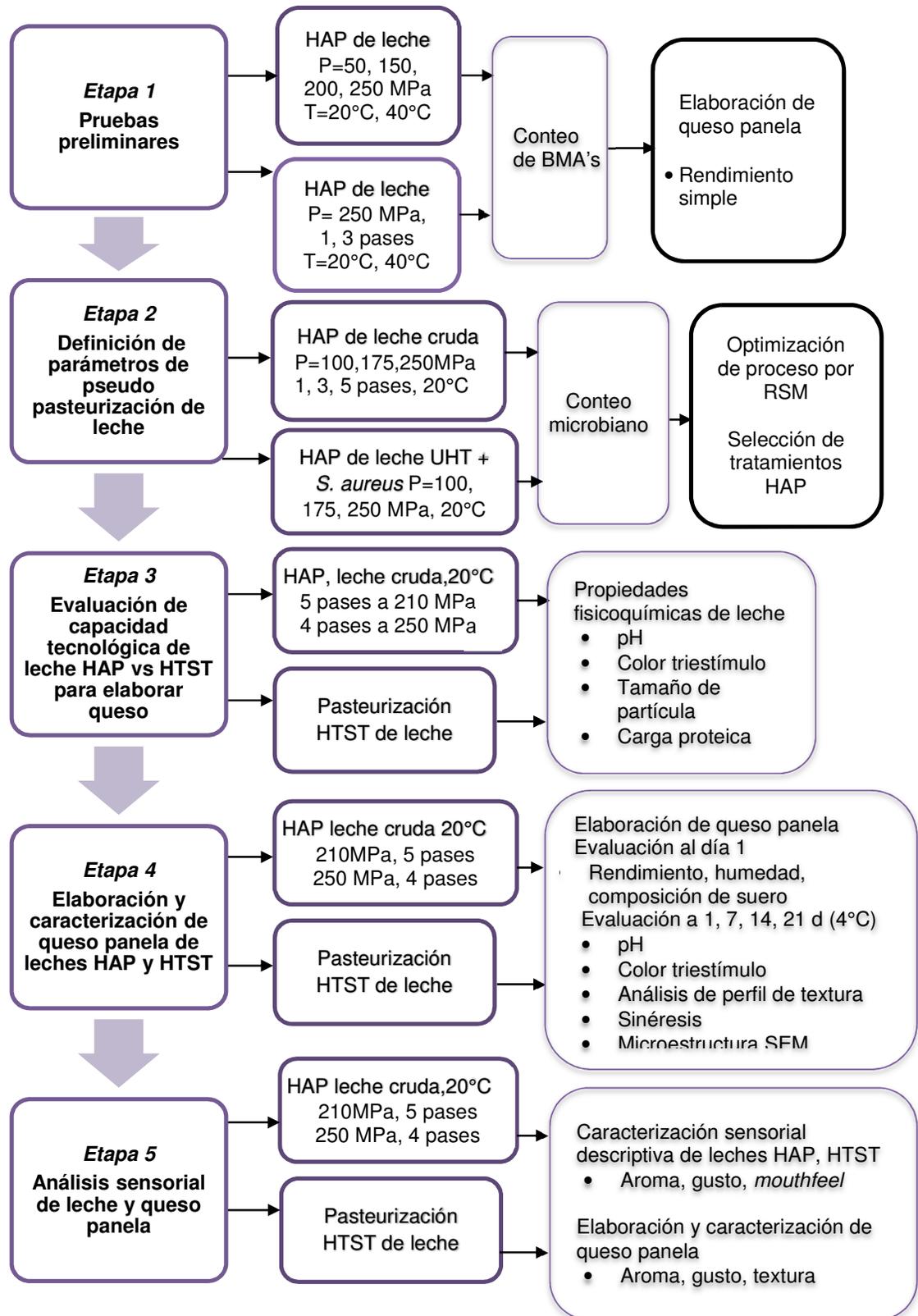


FIGURA 3.1 Diagrama general del plan de investigación

3.1.2 Etapa 2: Estudio de reducción de carga microbiana en leche mediante pases múltiples de HAP y capacidad tecnológica de la misma para elaborar queso fresco.

Una vez delimitado el rango de P a explorar y la Ti se evaluó la eficiencia de presiones de operación en dicho rango y ciclos de alta presión sobre la disminución de mesófilos aerobios y coliformes en leche. Se pasteurizó (HTST) leche bovina estandarizada y se empleó como control. De manera paralela, se exploró la eficiencia de los mismos parámetros HAP sobre muestras de leche UHT bovina entera (3% grasa) inoculadas con una concentración conocida de *S. aureus* ATCC 29213 (7.0- 7.5 log 10 UFC/ml) para conocer la eficiencia del proceso para inactivar el patógeno no esporulador identificado como el más barorresistente a la HAP (Diels *et al.*, 2003; Wuytack *et al.*, 2002). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado. Con los resultados de ambas experiencias y empleando un diseño de optimización se definieron las condiciones de proceso que representen tratamientos análogos a una pasteurización térmica desde el punto de vista de inocuidad microbiana y se confirmó la pasteurización de leche mediante una prueba colorimétrica de inactivación de fosfatasa alcalina. Finalmente, se evaluó la capacidad tecnológica de la leche tratada a PM de HAP para elaborar queso fresco a través de indicadores de capacidad tecnológica (tiempo de coagulación, firmeza de gel, capacidad de retención de agua y % de humedad en cuajada) para confirmar la pertinencia de las condiciones elegidas.

3.1.3 Etapa 3: Determinación de cambios fisicoquímicos en leches HAP y pasteurizada térmicamente

Se realizó una evaluación de cambios en propiedades fisicoquímicas selectas de leche HAP bajo las condiciones de proceso optimizadas, empleando leche cruda (en pruebas selectas) y HTST como controles. Las pruebas realizadas incluyen: pH, colorimetría triestímulo, tamaño de partícula (glóbulo graso y micela de caseína), carga proteica absorbida en glóbulo graso. En tratamientos selectos se llevará a cabo la determinación de indicadores de desnaturalización y posibles interacciones entre las fracciones proteicas (PAGE, FTIR, calorimetría diferencial de barrido).

3.1.4 Etapa 4: Elaboración de queso panela con leche pasteurizada térmicamente y por pases múltiples de HAP

Se elaboró queso panela con la leche procesada por HAP a las condiciones optimizadas y con leche pasteurizada. Los quesos procesados se empacaron al vacío y refrigeraron a 4°C. A todos los quesos se les realizaron diversas pruebas de calidad al tiempo 0 y, cuando fue requerido, a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento refrigerado. Los análisis realizados fueron: pH, colorimetría triestímulo, análisis de perfil de textura (TPA), rendimiento, % de humedad, composición de suero, sinéresis y microestructura por microscopía electrónica de barrido. Todas las pruebas se hicieron por duplicado.

3.1.5 Etapa 5: Análisis sensorial de leche y queso panela HAP

Se caracterizó sensorialmente leche HAP (aroma, gusto y *mouthfeel*) y quesos tipo panela (aroma, gusto y textura) elaborados con ésta mediante pruebas descriptivas empleando un panel entrenado (n=7, 6 mujeres, 1 hombre) conformado por estudiantes de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos de la BUAP. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

A excepción de las pruebas con microorganismos inoculados, todas las experiencias se realizaron con leche bovina adquirida con un proveedor local (Chipilo, Puebla), transportada a $T < 6^{\circ}\text{C}$, mantenida en refrigeración (4°C) hasta su uso y procesada el mismo día. Las pruebas de inoculación (sección 3.2.4) se llevaron a cabo con leche ultrapasteurizada entera (3% grasa) comercial (Lala® Comercializadora de Lácteos y Derivados, Gómez Palacio, Durango, México).

Para la elaboración de queso se utilizó cuajo microbiano de doble intensidad Cuamix ® (Chr. Hansen de México, México D.F) y cloruro de calcio grado alimenticio (Fabpsa S.A., Puebla, México).

3.2.2 Procesamiento de leche

La composición de leche cruda se determinó por duplicado mediante un analizador ultrasónico rápido (ver Sección 3.2.4); posteriormente, la leche cruda se termizó a 40°C; aproximadamente un 20% del volumen diario de proceso se separó mediante una descremadora centrífuga (FT 15, Armfield Ltd; Essex, Reino Unido), confirmando mediante análisis ultrasónico que el porcentaje de grasa en leche descremada estuviera por debajo del límite de detección del equipo (<0.05%). Finalmente, la leche cruda se estandarizó con leche descremada hasta alcanzar un porcentaje de grasa final del 3%; la composición final de leche cruda se corroboró por duplicado con el mismo analizador ultrasónico. Esto se realizó para evitar posibles cambios en el glóbulo graso durante la separación centrífuga. La leche cruda estandarizada se empleó como materia prima para el resto de los procesos, con excepción de las pruebas de inoculación. Todos los tratamientos HAP implementados se realizaron en un homogeneizador hidráulico *Stansted*, modelo nG7400:350 Hydrive (Stansted Fluid Power Ltd, Essex, Reino Unido). Este equipo consiste de dos intensificadores que hacen pasar a un fluido a alta velocidad a través de una válvula de alta presión fabricada en cerámica de alta resistencia capaz de soportar una presión operativa máxima de 250 MPa. Se aplicó además una segunda homogeneización en una válvula neumática que opera a 10% de la presión de la primera etapa (ver Figura 2.7). El flujo aproximado de leche fue de 15 L/h. La temperatura antes de la válvula de baja presión (T_i) y la temperatura de salida (T_s) se monitorearon durante toda la HAP. T_i se mantuvo constante a lo largo del proceso, de acuerdo al diseño experimental correspondiente. Cuando se aplicaron tratamientos con pases múltiples de HAP, la temperatura de leche se equilibró cuando fue necesario. Para ayudar a minimizar el efecto de calentamiento asociado a la aplicación de alta presión se colocó un baño recirculador con agua (4°C) de enfriamiento (FC-10, SEV, Puebla, México) acoplado a una chaqueta alrededor de la válvula de alta presión y un intercambiador de calor tubular con alimentación de agua fría (4°C) provista por un circulador de inmersión (Techne TE 10D, Staffordshire, Reino Unido). El homogeneizador se sanitizó y desinfectó al inicio del proceso y a cada ciclo en las pruebas con pases múltiples. Este proceso se llevó a cabo mediante un procedimiento adaptado del descrito por Briñez *et al.*,

(2006) el cual consiste en la circulación sucesiva de agua destilada, un detergente de fosfatos y una solución sanitizante (200 ppm de hipoclorito) y agua destilada nuevamente. Por su parte, la pasteurización térmica de leche se realizó en un intercambiador de calor de placas Armfield FT43, una unidad HTST de escala laboratorio (Armfield Ltd, Ringfield, Reino Unido) previamente sanitizada con un ciclo de limpieza idéntico al del homogeneizador. Para evitar recontaminación post-proceso del producto, la leche se colectó en envases de plástico grado alimenticio, los cuales se llenaron dentro de una campana de flujo laminar previamente sanitizada.

3.2.3 Elaboración de queso panela

Se eligió trabajar con queso panela, por ser un producto fresco (evitando las complicaciones inherentes a la maduración), sencillo de elaborar, sin adición de cultivo iniciador y típico de México, con un alto volumen de consumo; además, al ser un sistema metaestable, que tiende a desuerar durante el almacenamiento refrigerado (Lobato-Calleros *et al.*, 2006), resulta una matriz alimenticia adecuada para explorar el uso de HAP en la prevención de este fenómeno. El queso se produjo mediante un procedimiento estándar, que se describe en la Figura 3.2. Se produjeron tres quesos por lote, de aproximadamente 300 g cada uno. Dos de ellos se analizaron mediante las técnicas descritas en la Sección 3.2.5, mientras que uno permaneció en su empaque para evaluar su grado de desuerado, como se describe en esa misma sección.

3.2.4 Métodos de análisis de leche fluida

Los siguientes métodos analíticos se implementaron en diferentes etapas del presente trabajo para analizar las características fisicoquímicas y funcionales de leche bovina cruda, pasteurizada u homogeneizada. Todas las pruebas se realizaron por duplicado, excepto donde se indique lo contrario.

- a) Análisis composicional:** la composición porcentual de leche (humedad, lactosa, proteína, grasa, sales minerales) se determinó por un analizador rápido ultrasónico Lactoscan LA (Milkotronic LTD; Nova Zagora, Bulgaria).

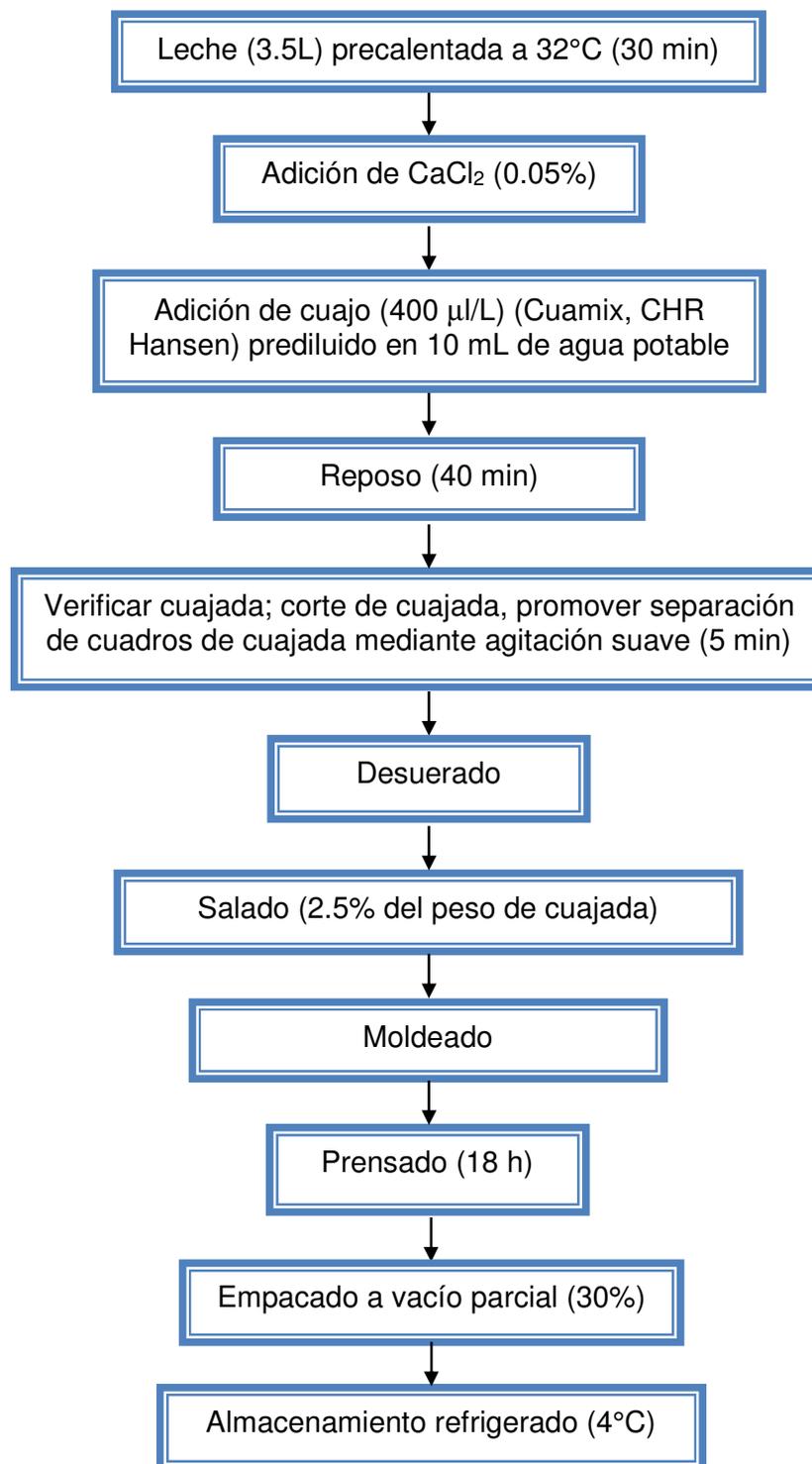


FIGURA 3.2. Procedimiento de elaboración de queso panela.

El analizador es un dispositivo que mide la velocidad del ultrasonido en leche, la cual depende de la concentración de sus componentes principales. Se tomó una muestra representativa (100 mL) de cada leche a analizar; las muestras permanecieron a temperatura ambiente. Para cada análisis se emplearon 25 mL de la muestra, mezclada por inversión en repetidas ocasiones para garantizar su homogeneidad.

- a) **Parámetros de calidad de leche:** El pH se determinó de acuerdo al método estándar con un pH metro convencional; las mediciones se realizaron en leche cruda a temperatura ambiente e inmediatamente después del proceso de conservación (HAP, pasteurización) tras equilibrar su T a la ambiental (Hayes y Kelly, 2003a); en los procesos HAP el pH también se determinó después de cada pase. La acidez titulable se evaluó por el método estándar (Hooi *et al.*, 2004), el cual consiste en una titulación de 9 ml de muestra homogénea a T ambiente (20°C) con una solución 0.1 N de NaOH con adición de una solución indicadora de fenofaleína; la titulación procede hasta detectar el primer tinte rosado durante 20 s, midiendo los mL requeridos de solución básica y expresando el resultado como % ácido láctico mediante la Ecuación 5. (Ec. 5)

$$\% \text{ ácido láctico} = (\text{ml NaOH} \times W \times 100) / \text{ml muestra} \quad (\text{Ec. 5})$$

donde

W= peso meq de ac. láctico = 0.009.

Un colorímetro triestímulo Hunterlab Colorflex EZ (Hunter Associates, Reston, VA) se empleó para medir los cambios en los parámetros de color L (luminosidad), *a* (rojo a verde) y *b* (amarillo a azul) de leche cruda y procesada de acuerdo a lo reportado por Gervilla *et al.* (2001). El colorímetro se calibró previamente con mosaicos negro y blanco y se operó colocando 9 mL de leche en una celda de medición sobre un inserto de 64 mm a un ángulo de 10° del iluminante D₆₅. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

- b) **Cambios en características del glóbulo graso de leche:** el análisis del tamaño promedio de glóbulos de grasa se realizó por un método de difracción láser empleando un analizador de tamaño de partícula Malvern serie 2600 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Inglaterra) con un láser de He-Ne operando a una longitud de onda de 633 nm; este método está basado en la solución de Mie, que establece que las partículas que pasen por una radiación electromagnética (como el láser) dispersarán luz a un ángulo directamente relacionado con su tamaño. Se determinó el índice de refracción de leche en un refractómetro Abbe para introducirse como dato al software del equipo (Mastersizer 2000 v. 5.6); posteriormente, se tomó una muestra de ~2 mL de leche con una pipeta Pasteur y se mezcló con agua destilada (25°C) empleando una unidad de dispersión de muestra Hydro 2000s (Malvern Instruments Ltd. Works, Inglaterra) hasta llegar a un porcentaje de obscuración adecuado (<20%). Las pruebas se condujeron a un ángulo de dispersión de 90°. Se obtuvo la distribución de tamaño, a partir de la cual se calculó el diámetro $D_{4,3}$, (diámetro volumétrico medio o de De Brouckere) que se define como el diámetro medio calculado con respecto a la fracción másica, el cual permite establecer la formación de agregados de gran tamaño y se expresa como:

$$d_{4,3} = \frac{\sum d_i^4}{\sum d_i^3} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde d_i es el diámetro de la i -ésima partícula.

De los datos de distribución de tamaño también se obtuvo el área superficial específica del glóbulo graso (S_w) definida como la razón del área y el producto de la densidad y el volumen de grasa en leche ($6/D_{4,3} \rho$), en m^2/mL (Michalski *et al.*, 2002) Sólo para los tratamientos HAP definidos en la etapa 2 se calculó la carga proteica del glóbulo graso, o cantidad de proteína adsorbida a consecuencia del proceso (mg de proteína por m^2 de área superficial de grasa) mediante la Ecuación 7

$$\gamma = \frac{(\rho_0 - \rho_s) \rho_f}{s a (f_n - f_s)} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde γ es la carga proteica; p_o y p_s son la cantidad de proteína en leche y fase sérica (las cuales se obtendrán por centrifugación a $10,500 \times g$ por 30 min a $20^\circ C$ con adición de 28.6 g de azúcar por cada 100 g de leche); p_f la densidad de la grasa láctea (asumida como constante); s_a : área superficial específica del glóbulo graso; f_o y f_s : fracción de grasa en leche y suero (obtenido como se describe anteriormente) (Cano-Ruiz y Richter, 1997). Las fracciones de grasa y proteína se determinaron por analizador rápido ultrasónico, como se describió previamente. Asimismo, se obtuvieron micrografías del glóbulo graso de leche en un microscopio compuesto equipado con una cámara digital. Se prepararon las muestras colocando una gota de leche (a <24 h post-proceso) en un portaobjetos, cubriéndola con un portaobjetos, dejándola reposar por 1 h y observándola en un microscopio óptico Carl Zeiss Axio Scope a un aumento de 100X, aplicando medios ópticos de contraste o Sudan III (Hayes y Kelly, 2003a). El tamaño promedio de los glóbulos grasos se estableció midiendo 10 glóbulos directamente de la micrografía empleando el software Axiovision LE (Carl Zeiss, Montreal, Canadá).

- c) **Cambios en proteínas lácteas:** se llevaron a cabo estas pruebas en tratamientos selectos para determinar posibles modificaciones estructurales en caseínas y proteínas de suero de leche; las determinaciones fueron: tamaño de micela, FTIR, PAGE, y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para observar posibles cambios en el tamaño de micela, incluyendo disminución por pérdida de fracciones o incremento por formación de complejos con proteínas globulares, muestras de leche homogeneizadas por inversión se diluyeron 1:10 en agua destilada y se analizaron en un difractómetro láser Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Inglaterra). Para obtener información adicional sobre la estructura de las proteínas y posibles cambios atribuibles a los procesos de HAP y HTST, se analizaron muestras de leche por FTIR (Vertex 70, Bruker Optics; Ettlingen, Alemania) en el modo de reflectancia total atenuada (ATR) en la región del infrarrojo medio (MIR) en un rango de 600 a 4000 cm^{-1}

usando línea base agua; se tomaron muestras de 30 μL de leche previamente homogeneizada en un vórtex; las mediciones se llevaron a cabo mediante escaneos de 60 s para la línea base y de 120 s para las muestras (equivalente a 120 mediciones espectrales). La medición de la línea base se realizó antes de la medición de cada una de las muestras de leche. Los espectros se procesaron y analizaron utilizando el software OPUS 7.0 (Bruker Optics). La formación de agregados proteicos se evaluó mediante pruebas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones no reductoras, de acuerdo a lo descrito por Anema y McKenna (1996). La electroforesis se efectuó en una cámara vertical Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell con una celda de poder apropiada (BioRad Labs Inc, Hercules, CA). El gel de separación contuvo 12.5% de acrilamida, dispersa en buffer 1.5M de Tris-HCl, a pH 8.8 y el gel concentrador se preparó con 6.7% de acrilamida en buffer 1.5M de Tris HCl, a pH 6.8; las muestras se dispersaron en buffer 1.5M de Tris HCl (pH 6.8) con azul de bromofenol como colorante trazador. La separación de proteínas de las muestras de leche se logró aplicando al gel una corriente de 110 V durante 2 h; posteriormente, los geles se tiñieron con azul brillante de Coomasie durante 1 h y se desteñieron con una solución de propanol al 10% (v/v) hasta obtener un contraste nítido (aprox. 15 h); la migración de proteínas específicas se estimó empleando un estándar sin teñir como marcador (Precision Plus Protein 161-0363, BioRad Labs Inc., California, EUA) y se elaboraron densitogramas a partir de los geles, empleando el software GelAnalyzer 2010 (Lazar, 2010), y con ellos se calcularon cambios en concentración de proteínas lácteas específicas, comparando cocientes de concentraciones relativas en leche tratada vs. cruda (Anema, 2012). Los reactivos de PAGE se obtuvieron de Sigma Aldrich (Toluca, México). Finalmente, las pruebas de DSC se efectuaron en un equipo de análisis termogravimétrico/ calorimetría diferencial de barrido Netzsch STA 449 F3 (Netzsch GmbH, Selb, Alemania). Para tal fin se colocaron 9-10 mg de leche en una cápsula de Al_2O_3 , empleando otra cápsula idéntica vacía como referencia; ambas se sellaron y se empleó N_2 como gas de protección. La muestra se equilibró a 25°C y posteriormente se calentó hasta 100°C a una velocidad de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Se obtuvieron

termogramas de las muestras de leche al graficar el flujo de calor (W/g) contra temperatura (°C) y la temperatura de transición (desnaturalización) se asumió como aquella alcanzada en el vértice del pico endotérmico.

- d) **Cambio en capacidad tecnológica de la leche para elaborar queso:** Para identificar posibles modificaciones en la capacidad tecnológica de la leche procesada por HAP en comparación con leche HTST se condujeron pruebas de tiempo de coagulación por renina (TCR) y de rendimiento potencial para quesería. Se prepararon muestras de leche cruda, pasteurizada y HAP como describen Pandey *et al* (2000) con adaptaciones menores. Se pesaron muestras de 100g de leche en un vaso de precipitado y se termizó a 32°C en un baño de temperatura controlada con agitación suave; posteriormente, se agregaron 400 µl/L de cuajo microbiano (Cuamix, Chr. Hansen, México) previamente diluidos en 2 mL de agua potable. Inmediatamente después de agregar el cuajo, se vertieron 30 g de leche en tres tubos de centrífuga y se usaron para determinar el rendimiento teórico; el remanente se distribuyó en tubos de ensaye de pared delgada (3mL por tubo) y se emplearon para calcular TCR. Todos los tubos se regresaron al baño. El TCR se calculó de acuerdo al método Berridge, como el tiempo desde la adición del cuajo hasta la formación de flóculos visibles en las paredes del tubo (Zobrist *et al.*, 2005). Por su parte, los tubos de centrifuga permanecieron en el baño durante 30 min y, tras coagular, se centrifugaron a 5000 rpm por 55 min a 10°C (Zamora *et al.*, 2007). La cuajada se separó y se determinó su contenido de humedad por deshidratación en horno de convección, como se describe en la sección 3.25. El rendimiento potencial se obtuvo dividiendo el contenido de humedad de la cuajada de cada tratamiento entre aquel obtenido para leche cruda y se expresó como porcentaje (Zamora *et al.*, 2007).
- e) **Pruebas microbiológicas:** dos tipos de conteos microbiológicos se condujeron a través de experimentos independientes, antes y después de los tratamientos de conservación implementados (HAP, pasteurización). En el primero, se realizó el conteo de microorganismos indicadores endógenos en leche cruda, estandarizada de acuerdo a la metodología descrita en la

sección 3.2.2; se determinaron las cuentas de bacterias mesófilas aerobias (BMAs) (NOM, 1995a) y de coliformes totales (NOM, 1995b). En el segundo, se contabilizó la supervivencia del microorganismo patógeno con mayor resistencia a HAP (*Staphylococcus aureus*) inoculado en leche bovina ultrapasteurizada (UHT) comercial (ver sección 3.2.1). La cepa empleada fue *S. aureus* ATCC 29213; para su crecimiento se transferirá una azada del cultivo a caldo infusión cerebro-corazón BHI (DIFCO, Sparks, MD, EEUU) y se dejará crecer a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20h. Se prepararon cultivos inclinados de agar soya tripticaseína (AST) en tubos de ensaye con tapón rosca, los cuales se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. Los tubos se mantuvieron a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ a lo largo de todo el proyecto. Para cada experimento se inoculó una azada del cultivo inclinado de *S. aureus* en 70 ml de BHI y se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20-24 h, de la cual se obtuvieron 0.1 mL de muestra y se sembró por extensión en superficie en AST para determinar la concentración inicial del inóculo por cuenta estándar. Después de la incubación, el BHI se mezcló de forma homogénea con leche UHT (25°C) a una razón 1:100 (v/v), manteniendo la concentración inicial microbiana aproximadamente constante ($\sim 1 \times 10^8$); esta leche se sometió al tratamiento correspondiente (HAP o HTST). Para ambos experimentos los análisis se llevaron a cabo antes y después del proceso de conservación. Se prepararon diluciones decimales seriales de leche en agua peptonada (10 g/L de peptona) y se sembraron por vertido en placa por duplicado en medios específicos. Las condiciones de preparación e incubado se hicieron de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3.1. Las BMAs se contabilizaron por duplicado por vertido en placa de agar soya tripticaseína, incubando a $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h, mientras que las bacterias coliformes totales se contabilizaron por vertido en placas de agar rojo violeta bilis lactosa, incubando a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h y las cuentas de *S. aureus* también se determinaron en placas de agar soya tripticaseína, pero incubando a 37°C por 48 horas. Se seleccionaron placas con conteo de colonias entre 15 y 150 y se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) calculando el factor de reducción logarítmica (S) como la diferencia de log (UFC) antes y después del tratamiento de conservación.

TABLA 3.1. Pruebas microbiológicas en leche cruda y ultrapasteurizada inoculada

Tipo de leche	Microorganismo enumerado	Medio de cultivo	Incubación
Ultrapasteurizada inoculada	<i>S. aureus</i>	AST	37°C, 48h
Cruda	BMA's	AST	32°C, 48h
Cruda	Coliformes totales	ARVBL	35°C, 24h

AST: Agar Soya tripticaseína

ARVBL: Agar rojo violeta bilis lactosa

3.2.5 Métodos fisicoquímicos de análisis de queso panela

Se realizaron las siguientes pruebas con queso panela al día 1 de elaboración y durante el almacenamiento refrigerado (7, 14, 21 d), excepto donde se indica lo contrario; todas las pruebas se hicieron por duplicado. El muestreo del queso se hizo por medio de un sacabocados de 2 cm de diámetro, tomando la muestra en el costado del producto y eliminando aproximadamente 2 mm de la superficie, cuya composición pudo variar por deshidratación superficial. Previo al análisis, las muestras se molieron en una licuadora comercial.

- a) **Análisis bromatológico:** se determinó la composición de los quesos panela al día 1 de elaboración, de acuerdo a métodos estándar (Hooi *et al.*, 2004; AOAC, 1990); la determinación de pH, por su parte, se efectuó a los días 1, 7, 14 y 21 de almacenamiento refrigerado. El pH se midió mediante un pH metro Jenway 3505 (Bibby Scientific; Staffordshire, Reino Unido) adecuadamente calibrado, en un vaso de precipitado con 20 g de queso molido; el electrodo se introdujo en tres zonas diferentes del queso y se registró el valor de pH tras 2 min de contacto. La humedad se precisó mediante deshidratación en horno de convección (100°C), pesando 3 ± 0.25 g de muestra, colocándola en charolas de aluminio de 5.5 cm de diámetro (pre-equilibradas a 100°C durante 3 h) cubierta

con una almohadilla de fibra de vidrio y secándola durante 5 h en un horno de vacío; se permitió que la muestra se enfriara en un desecador y posteriormente se pesó. La grasa butírica se cuantificó por el método Gerber; una muestra de 3 g de queso se colocó en un butirómetro para quesos al que previamente se le añadieron 10 mL de ácido sulfúrico (gravedad específica 1.82-1.83) y 3 mL de agua destilada a 60°C; se agregaron entonces 1 mL de alcohol isoamílico y suficiente agua destilada a la misma temperatura para elevar el volumen del líquido. El butirómetro se tapó y agitó hasta eliminar las partículas grandes de queso y después se separó la grasa en una centrífuga Nova Safety (Funke Gerber, Berlín, Alemania) a 1300 rpm durante 5 min), se colocó en un baño de agua a 65°C por 3-5 min y se leyó el porcentaje de grasa del cuello graduado, repitiendo los ciclos de centrifugado si es necesario. El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl, colocando 1g de muestra de queso molido en un tubo de digestión con ácido sulfúrico (20 mL) y mezcla digestora; el tubo se colocó en un bloque de digestión rápida (Rapid Digestor, Labconco Inc., Kansas City, MO) a 480°C hasta obtener una solución clara. Tras enfriar la muestra, se añadieron 10 mL de agua desionizada, se alcalinizó con una solución de NaOH 40% (v/v) y se sometió a una destilación por vapor en un aparato rápido (Rapid Still II; Labconco Inc., Kansas City, MO), recuperando el amoníaco de la muestra en 50 mL de solución de ácido bórico (4% v/v), el cual será finalmente titulado con una solución 0.1N HCl. El contenido de proteína se calculó con un factor de 6.38 a través de la siguiente relación:

$$Proteína (\%) = \left[\frac{V \times N \times 1.4008}{W} \right] \times 6.38 \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

V= Volumen de solución de HCl (mL)

N= Normalidad solución de HCl (mL)

W= Peso de muestra (g)

- b) **Rendimiento:** se calculó como rendimiento simple, dividiendo el peso del queso después del prensado entre el peso de la leche empleada (Emmons *et al.*, 1991). Se evaluó la recuperación de grasa y proteína en el queso como se describe por San Martín-González *et al.* (2007):

$$R (\%) = \frac{\% \text{ Componente en } P * \text{ cantidad de } P}{\% \text{ Componente en } L * \text{ cantidad de } L} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde:

R= Recuperación de componente

P= Producto

L= Leche

- c) **Composición del suero y sinéresis:** Una vez concluido el proceso de separación de cuajada (ver Fig. 3.1) el suero se reservó y se determinó su composición (humedad, lactosa, proteína, grasa, sales minerales) mediante un analizador rápido ultrasónico Lactoscan LA (Milkotronic LTD; Nova Zagora, Bulgaria) adecuadamente calibrado, para evaluar la retención de proteína sérica en la matriz del queso. En muestras de quesos que no se abrieron durante el transcurso del periodo de almacenamiento refrigerado (21 d), se recuperó el suero expelido y se pesó en una balanza analítica, reportando la pérdida de peso del queso asociada con el grado de sinéresis.
- d) **Color:** la determinación del grado de luminosidad (L) y los parámetros a, rojo (+) a verde (-) y b, amarillo (+) a azul (-), se llevaron a cabo con los mismos parámetros de medición y técnica de calibración descritos en la sección previa. En cada día de medición, el queso se cambió a una nueva bolsa de plástico estéril y las determinaciones se hicieron en tres secciones diferentes de la superficie del queso, determinando los parámetros de diferencia neta de color, ángulo de tonalidad (hue) e índice de saturación (cromacidad) como se describe en Zamora *et al.* (2011).
- e) **Análisis de Perfil de Textura (TPA):** se empleó un texturómetro TAXTPlus (Stable Microsystems; Surrey, Reino Unido) para realizar un TPA de queso panela y así evaluar características físicas tales como dureza, elasticidad (capacidad de recuperar su forma tras ser sometido a una fuerza externa) y cohesividad (como se comporta el queso ante una segunda deformación en relación a como se comportó con una primera) (Bourne, 2002). Las muestras se obtuvieron con un sacabocados cilíndrico de 1.4 cm de diámetro y se cortaron hasta obtener cilindros de 2 x 1.4 cm. Las muestras se ajustaron a 20°C antes de realizar la prueba. Ésta se realizó utilizando una doble compresión con

velocidad de 2mm/s y 50% de deformación. Se obtuvieron gráficas de fuerza vs tiempo y los parámetros de dureza, elasticidad y cohesividad se calcularon a través del software incluido en el equipo (Texture Exponent) como la fuerza máxima en el primer pico, la razón de distancia para alcanzar la fuerza máxima en la segunda compresión vs. la primera y la razón entre áreas bajo la curva de la segunda y la primera compresión (Bourne, 2002).

- f) **Microestructura:** la microestructura de quesos se determinó por microscopía electrónica de barrido (SEM) de acuerdo a la metodología propuesta por Lobato-Calleros *et al.* (2006). Se obtuvieron muestras de la parte central de quesos HAP o HTST con un sacabocados cilíndrico de 0.5 cm de diámetro, ajustando su altura a 1 cm con un estilete. Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2% en un buffer de fosfato (0.1M, pH 7.2); posteriormente, se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol de concentración incrementada (50, 60, 70, 80, 90 y 100%) durante 1 h cada una, resguardándose en acetona hasta su procesamiento final, que se realizó en el Laboratorio de Microscopía del Instituto de Ecología, A.C. (Xalapa, Veracruz, México). Las muestras se deshidrataron con CO₂ en un secador de punto crítico SAMDRI-708A (Tousimis, Rockville, MD) y se metalizaron por *sputtering* (HUMMER VI-A, Anatech Ltd., Battle Creek, Michigan, EUA) con una capa fina de oro; las observaciones se realizaron en un SEM JEOL JSM-5600LV a 15 Kv, empleando una magnificación de 3000X.

3.2.6 Análisis sensorial descriptivo

Se reclutaron estudiantes ($n \sim 25$) de la Facultad de Ingeniería Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla como participantes de acuerdo a su interés, disponibilidad de tiempo y a los resultados de un cuestionario de preselección, donde se determinó si el aspirante padecía alguna enfermedad, tomaba un medicamento, tenía un hábito (p.e. fumar) o una actitud inapropiada (inflexible, negativo, incapaz de trabajar en equipo) que pudiera alterar su habilidad para evaluar productos. De manera inicial, se realizó una sesión informativa sobre el análisis sensorial y los alcances de las pruebas a realizar. Posteriormente, la selección de miembros del panel se llevó a cabo mediante

pruebas encaminadas a determinar la habilidad de cada participante para detectar, diferenciar entre y reconocer/ describir estímulos sensoriales. En todo momento los participantes contaron con agua potable y palitragos para ayudar a limpiar sus papilas gustativas y café en grano para mantener sus habilidades olfativas. Primero, se estableció la capacidad del evaluador para reconocer gustos básicos; estos se obtuvieron preparando soluciones de sustancias específicas relacionadas con estos atributos: dulce (sacarosa 32 g/L), ácido (ácido cítrico, 1 g/L), amargo (naringina 0.15 g/L) salado (cloruro de sodio, 6g/L) y umami (glutamato mono sódico 0.15 g/L). A continuación, se determinó la capacidad de los evaluadores para ordenar por intensidad soluciones con concentraciones menores o mayores a las antes indicadas. De forma paralela se llevaron a cabo pruebas con cartas de Ishihara para detectar posibles defectos de visión de los participantes. Con la finalidad de establecer su habilidad para discriminar estímulos, los evaluadores realizaron 15-20 pruebas triangulares con leche UHT comercial, de dos marcas similares y, posteriormente, realizaron pruebas de asociación e identificación de aromas, empleando un kit de aromas comerciales (frutales, vainilla, caramelo, madera, nueces, semillas, entre otros) y productos lácteos selectos. Con los resultados de las pruebas de diferenciación se llevo a cabo un análisis secuencial de cada participante y se aceptaron dentro del panel a aquellos que pasaron de la línea de aceptación, definida por la razón p de respuestas correctas que obtendría el potencial panelista si continuara evaluando indefinidamente. La aceptación de los candidatos se basó en su desempeño: aquellos con capacidades de evaluación iguales o superiores a un valor limitante p_1 fueron aceptados, mientras que aquellos con habilidades por debajo del valor p_0 fueron rechazados. Se graficó el número de pruebas m contra el número de respuestas correctas n y dos líneas (L_0 y L_1) con la misma pendiente y que dividieran la gráfica en tres áreas: *aceptación*, *indecisión* (o *continúa evaluando*) y *rechazo*. Los parámetros de las líneas (la pendiente s y los interceptos h_0 y h_1) se definieron por p_1 , p_0 , β (probabilidad de rechazar a un panelista capaz) y α (probabilidad de seleccionar a un panelista inaceptable) mediante las Ecuaciones 10-12 (Gallerani *et al.*, 2000).

$$S = \frac{\ln \frac{1-p_0}{1-p_1}}{\ln \frac{p_0}{p_1} + \ln \frac{1-p_0}{1-p_1}} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$h_0 = \frac{\ln \frac{1-\beta}{\alpha}}{\ln \frac{p_0}{p_1} + \ln \frac{1-p_0}{1-p_1}} \quad (\text{Ec. 11})$$

$$h_1 = \frac{\ln \frac{1-p_0}{1-p_1}}{\ln \frac{p_0}{p_1} + \ln \frac{1-p_0}{1-p_1}} \quad (\text{Ec. 12})$$

Los panelistas recibieron sesiones de entrenamiento para la identificación de atributos específicos de los productos lácteos a analizar. Para la identificación de aromas relacionados con este tipo de productos se emplearon como referencias productos lácteos comerciales selectos (yogurt natural, crema ácida, crema fresca, leche en polvo, queso parmesano, mantequilla, fórmula láctea, queso panela, queso tipo *petit suisse*), productos lácteos procesados *in situ* (leche entera sobretratada térmicamente ó cocida; leche entera quemada, suero pasteurizado de queso panela), leche cruda y alimentos y productos diversos cuyos aromas y sabores característicos se relacionan con defectos previamente reportados en leche fluida (Álvarez, 2009; Chapman *et al.*, 2001) y quesos frescos (Hnosko *et al.*, 2009) incluyendo levadura de panificación, cartón, plástico, hierro oxidado, aceite vegetal quemado y hojuelas de maíz); adicionalmente, para identificar la consistencia asociada de la leche se empleó crema ligera UHT para cremosidad y aceite vegetal comestible para sensación oleosa mientras que para quesos se emplearon variedades como parmesano, ricotta, fresco, tipo manchego y crema como referencias. A través de pruebas de perfil sensorial, los panelistas reconocieron y describieron atributos asociados con diversas marcas comerciales de algunos de los productos antes mencionados (yogurt, crema ácida, leche entera, queso panela) y por comparaciones con los estándares y empleando una escala de 100 puntos con cinco categorías, desde *baja* hasta *alta* (Figura 3.3) establecieron de manera consensuada si el estímulo de la referencia estaba presente y la intensidad asociada con el mismo, así como las notas primordiales inherentes al producto

evaluado, con la finalidad de definir los descriptores a emplearse durante la evaluación de leches y quesos HAP y HTST. Las sesiones estuvieron coordinadas por un líder de panel y contaron con personal de apoyo para preparar e identificar referencias y muestras.

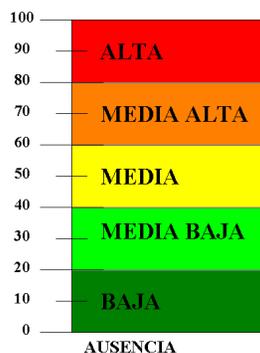


FIGURA 3.3 Escala de intensidad de atributos para pruebas descriptivas

Los jueces entrenados evaluaron por duplicado muestras de leche (volumen total de 1 L de cada leche, por sesión) y quesos Panela (150 g por sesión) HTST y HAP, procesadas el mismo día y mantenidas a 4°C hasta su análisis. Se determinó el número de atributos de aroma, gusto y *mouthfeel* (en leche) requeridos para describir las muestras. El número de variables dependientes (atributos) se redujo por Análisis de Componentes Principales (PCA) empleando XLSTAT Pro (Addinsoft, 2010, EUA), estableciendo el número de factores subyacentes requerido y la proporción de la varianza total que explicaba (Chapman *et al.*, 2001). Todos los formatos empleados para la selección de panel y entrenamiento de panelistas se incluyen en el Anexo 1.

3.2.7 Diseño experimental

Los diseños experimentales empleados en las etapas indicadas en el Plan de Investigación se describen a continuación. Salvo cuando se indique lo contrario, todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y todas las mediciones por triplicado. Todas las pruebas se analizaron mediante el software Minitab 16.0 (Minitab Inc, State College, PA, EUA). Las diferencias entre tratamientos se analizaron por ANOVA de una sólo vía o de doble vía, dependiendo del número de

variables independientes usadas; posteriormente, las comparaciones entre medias se realizaron mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

- a) Etapa 1: se realizaron dos series de experimentos diferentes. El primero fue un diseño completamente aleatorizado con P (50, 150, 200, 250 MPa) y Ti (20, 40°C) de HAP como variables independientes y reducción de BMA's en leche y rendimiento quesero como variables dependientes. Las diferencias entre tratamientos se analizaron por modelo lineal general ($\alpha=0.05$). El segundo, de naturaleza exploratoria, se realizó sin réplica, procesando leche con 1, 3 pases de P=250 MPa con diferentes Ti (20, 40°C) y analizando las mismas variables de respuesta en la leche tratada y los quesos elaborados con la misma.
- b) Etapa 2: Se usó un diseño experimental de caras centradas de dos factores, con tres niveles cada uno. Las variables independientes fueron P (100, 175, 250 MPa) y NP (1, 3, 5), mientras que las dependientes fueron las reducciones logarítmicas en cuentas de BMA's y *S. aureus*, como indicadores de calidad microbiológica y sobrevivencia del patógeno más barorresistente, respectivamente. Se aplicó una metodología de superficie de respuesta para optimizar individualmente las reducciones de ambas respuestas para determinar la combinación de P y NP que lograra una reducción mínima de 5 log₁₀ de BMAs en leche cruda y de *S. aureus* en leche ultrapasteurizada inoculada. Se emplearon expresiones polinómicas de segundo orden como funciones de aproximación. El modelo cuadrático se expresó como:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde:

Y= Variable de respuesta

x_i, x_j = Variables independientes

b_0 = Variable del coeficiente de regresión para el intercepto

b_i = Variable del coeficiente de regresión lineal

b_{ii} = Variable del coeficiente de regresión para el término cuadrático

b_{ij} = Variable del coeficiente de regresión para el término de interacción

Para propósitos predictivos, NP se consideró como variable discreta. Se aplicó un procedimiento de eliminación de variables paso a paso (hacia atrás) para

excluir a todas aquellas que no contribuyeran significativamente ($p < 0.05$) con el ajuste global. Se calculó el conjunto de parámetros que minimizara la suma de cuadrados del error (SSE); para cada caso, la adecuación del modelo se evaluó usando el coeficiente de regresión ajustado ($\text{adj. } R^2$); asimismo, se elaboraron gráficas de residuales vs. valores ajustados para verificar la normalidad de la distribución y una varianza constante. Finalmente, se generaron diagramas de contorno de las respuestas y se superpusieron para hallar una posible región donde ambas variables dependientes, como funciones de P y NP, se situarán dentro del rango mínimo de valores deseables de reducción microbiana ($5 \log_{10}$) (Maas, 2008). De esta región se eligieron dos posibles tratamientos HAP a dos condiciones diferentes de P, aproximando el NP al entero inmediato superior.

- c) Etapa 3: las pruebas para determinar cambios fisicoquímicos en leche HAP que permitieran establecer la viabilidad para emplearla como materia prima para elaboración de queso se hicieron de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado, con tipo de tratamiento ($n=3$) como variable independiente. Los tratamientos implementados fueron pasteurización HTST y los dos tratamientos obtenidos de la etapa de optimización previa. Se empleó leche cruda como control. Las variables dependientes fueron: pH, color triestímulo (L, a, b), tamaño de partícula por difracción láser y carga proteica.
- d) Etapas 4 y 5: Mediante un nuevo grupo de experimentos equivalentes a los realizados en la etapa 3 se elaboraron quesos Panela empleando leche HTST y tratada por PM de HAP bajo las condiciones optimizadas definidas en la Etapa 2. De esta forma se implementó un diseño completamente aleatorizado con tipo de tratamiento como variable independiente. Los quesos fabricados con leche HTST y con tratamientos selectos de PM de HAP (equivalentes a una pseudopasteurización térmica) se les realizaron diversas pruebas de eficiencia tecnológica al tiempo 0 (rendimiento, % de humedad, composición de suero) y durante el almacenamiento refrigerado a 4°C (7, 14 y 21 días, cuando aplicó). Las variables dependientes fueron pH, color (L, a, b), análisis de perfil de textura, TPA (midiendo dureza, cohesividad y elasticidad) y sinéresis y microestructura por microscopía electrónica de barrido (sólo a los 21 días de almacenamiento).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación preliminar parámetros de proceso HAP en leche fluida

Se determinaron por duplicado las reducciones en cuentas logarítmicas de BMAs nativas de leche homogeneizada con un solo pase a diferentes condiciones de P (50, 150, 200, 250 MPa) y Ti (25, 40°C), así como parámetros de calidad (rendimiento, análisis de perfil de textura, color) de quesos Panela elaborados con éstas. La magnitud de la reducción en la microbiota nativa de leche se incrementó con P y Ti, como ha sido reportado previamente (Briñez *et al.*, 2006; Tahiri *et al.*, 2006; Diels *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2002). El tratamiento a 50 MPa, 20°C, el nivel más bajo de P y único fuera del rango de AP, redujo <1 ciclo logarítmico las cuentas bacterianas de leche (0.13 ± 0.02). Se realizó el análisis estadístico correspondiente (ANOVA de doble vía) con todos los tratamientos remanentes y éste mostró un efecto significativo de P ($p < 0.05$), más no de Ti. La reducción en cuentas microbianas no varió significativamente por efecto de los tratamientos HAP a 150 y 200 MPa a las dos Ti empleadas (1.35 ± 0.02 y 1.51 ± 0.62 a 150 MPa y 1.71 ± 0.41 y 2.49 ± 0.29 a 200 MPa, a Ti= 20 y 40°C, respectivamente) pero ambos procesos a 250 MPa disminuyeron la población microbiana significativamente ($p < 0.05$) en >3 ciclos logarítmicos. Cabe mencionar que el tratamiento HAP a 250 MPa, 20°C fue el único que no difirió estadísticamente ($p < 0.05$) de los HTST (4.3 ± 0.4) en términos de su efectividad antimicrobiana. Como puede observarse en la Tabla 4.1, ninguno de los tratamientos implementados produjo una reducción de al menos cinco ciclos logarítmicos en las cuentas de BMAs de leche cruda, lo cual indica que las condiciones de HAP probadas resultan insuficientes para garantizar la inocuidad del producto y por tanto no resultan apropiadas para elaboración de subproductos lácteos. Para el tratamiento HAP a 250 MPa, el incremento en Ti produjo una disminución en la eficiencia del proceso, lo cual contradice los resultados de la bibliografía antes mencionada y lleva a considerar la presencia de una posible recontaminación postproceso; para leche HTST este hecho

Resultados y discusión

se pudo comprobar mediante el uso de un kit comercial de actividad de fosfatasa alcalina basado en una reacción colorimétrica con fenilfosfato de sodio (Hycel de México, D.F.), la cual resultó negativa, indicando que, efectivamente, se había pasteurizado la leche en los términos indicados por la normativa internacional y las cuentas microbianas obtenidas provenían primordialmente de recontaminación, lo cual es usual en procesos comerciales.

La insuficiencia de los parámetros de proceso estudiados para reducir la población microbiana de leche a niveles seguros para su consumo se reflejó en la vida útil de los quesos frescos elaborados. Todos aquellos fabricados con leche HAP a $P < 200$ MPa presentaron una vida de anaquel muy corta (< 1 semana) aún bajo almacenamiento refrigerado; esto resulta consistente con los resultados de las pruebas microbiológicas arriba citadas. El rendimiento se incrementó con P y Ti, aunque no significativamente ($p < 0.05$) debido a la alta variabilidad (Tabla 4.2). Aunque el rendimiento aumentó hasta en 4% con relación al de los quesos HTST (10.93 ± 0.98 , $n=14$, cada uno elaborado el mismo día que el tratamiento aleatorio correspondiente), los quesos HAP desarrollaron características funcionales únicas, ajenas a un queso panela (p.e. textura muy suave, fundibilidad), y con aquellos tratados a $P=250$ MPa, la vida útil se incrementó sustancialmente (> 2 meses).

TABLA 4.1 Reducción de BMAs en leche entera cruda por HAP a diferentes presiones de operación y temperaturas de entrada.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)	
	20	40
50	0.13 ± 0.02 ^A	ND
150	1.35 ± 0.02 ^{Ba}	1.51 ± 0.61 ^{Ba}
200	1.71 ± 0.41 ^{Ba}	2.49 ± 0.29 ^{Ba}
250	3.82 ± 0.22 ^{Ca}	3.26 ± 0.03 ^{Ca}

ND: No disponible

Superíndices diferentes en mayúscula en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Superíndices diferentes en minúscula en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Resultados y discusión

En general, se observó que, a mayor rendimiento, se presentaban defectos texturales con mayor intensidad, en particular, en términos de cohesividad de cuajada y de formación de grietas y fisuras; estos defectos se hacían más evidentes al empacarse al vacío, pues en ocasiones, la estructura del queso incluso tendía a colapsarse. Previamente ya se han reportado defectos texturales en quesos tratados por alta presión; esto se ha relacionado con un exceso de humedad en la estructura del queso (Drake *et al.*, 1997). Además, durante el almacenamiento refrigerado, los quesos, sobre todo aquellos de mayor rendimiento presentaban una sinéresis intensa, lo cual reflejaba la incapacidad de la matriz proteica para retener la humedad captada. Para evaluar el efecto del día de elaboración, se calculó el incremento del rendimiento de cada queso HAP con relación al queso HTST fabricado en la misma fecha (Tabla 4.3). El ANOVA muestra un efecto significativo de T_i sobre el rendimiento, con $T_i=40^\circ\text{C} > T_i=20^\circ\text{C}$. Sin embargo, dado el efecto negativo del exceso de humedad sobre la textura del queso, se decidió explorar nuevas variables de proceso HAP para encontrar condiciones intermedias, que permitieran un aumento en la humedad de la cuajada minimizando los defectos texturales, asegurando la inocuidad de la leche y sus productos derivados. Considerando que $P=250$ MPa representaba el límite práctico del equipo empleado y que el incremento de T_i de leche generaba importantes defectos texturales en los quesos, se optó por explorar al uso de pases múltiples (PM) como parámetro de proceso adicional. Se ha reportado que el uso de PM de HAP tienen un efecto aditivo sobre la inactivación microbiana (Maresca *et al.*, 2011; Picart *et al.*, 2006) y por tanto pueden emplearse en lugar de aumentos en P si existe alguna limitante práctica, como la prevalente en este caso. Se ha reportado que la P mínima requerida para reducir 5 ciclos log de BMA's en leche mediante un solo pase es de 330 MPa (Pereda *et al.*, 2007). Dadas las limitaciones de máxima P de operación antes mencionada, se exploró el uso de 1-3 PM de HAP a 250 MPa, con $T_i=20^\circ\text{C}$. Los resultados de la reducción de cuentas de BMA's en leche tratada a PM de HAP se presentan en la Tabla 4.4. Como puede observarse, la reducción en cuentas de BMA's se incrementó con la aplicación de PM, lo cual es consistente con reportes previos en leche (Picart *et al.*, 2006; Vachon *et al.*, 2002) y en otras matrices alimenticias (Maresca *et al.*, 2011). Sin embargo, con $PM=3$, las cuentas microbianas se incrementaron. Esto

se atribuyó a una contaminación postproceso, probablemente durante la recolección de leche, aún cuando este proceso se llevo a cabo bajo condiciones higiénicas (bajo campana de flujo laminar). De nuevo, la reducción de cuentas de BMA's en leche pasteurizada no alcanzó 5 ciclos log, por la misma razón expuesta. La recontaminación microbiológica postproceso de leche generalmente es causada por psicrotrofos Gram- y ocurre durante la transferencia y el llenado (Rudolph, 2010). A pesar de ello, se hizo manifiesta la necesidad de emplear PM de HAP en etapas subsecuentes.

TABLA 4.2 Rendimiento de queso panela elaborado con leche HAP a diferentes presiones de operación y temperaturas de entrada.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)	
	20	40
50	11.88 ± 0.92 ^A	ND
150	12.11 ± 0.05 ^{Aa}	12.09 ± 0.99 ^{Aa}
200	12.34 ± 0.68 ^{Aa}	13.14 ± 3.02 ^{Aa}
250	13.95 ± 1.22 ^{Aa}	15.10 ± 2.59 ^{Aa}

ND: No disponible

Superíndices diferentes en mayúscula en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

Superíndices diferentes en minúscula en la misma fila indican diferencia significativa (p<0.05)

TABLA 4.3 Incremento de rendimiento de queso panela elaborado con leche HAP con respecto a quesos HTST

Presión (MPa)	Temperatura (°C)	
	20	40
50	0.90 ± 0.57 ^A	ND
150	1.12 ± 0.13 ^{Aa}	2.19 ± 1.23 ^{Aa}
200	0.51 ± 0.23 ^{Aa}	2.59 ± 0.93 ^{Ab}
250	2.12 ± 0.77 ^{Aa}	4.72 ± 1.68 ^{Ab}

ND: No disponible

Superíndices diferentes en mayúscula en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

Superíndices diferentes en minúscula en la misma fila indican diferencia significativa (p<0.05)

TABLA 4.4 Reducción de BMA's en leche procesada por PM de HAP a 250 MPa

Pases	Reducciones log (CFU/mL)*
1	3.49 ± 0.15
2	5.11 ± 0.22
3	4.18 ± 0.39
HTST	4.29 ± 0.31

* Medias de duplicados

Posteriormente, se elaboró queso panela siguiendo el protocolo descrito en la sección previa, empleando leche HAP a 250 MPa con PM= 1 y 3 y $T_i=20^{\circ}\text{C}$, 40°C ; se observaron cambios notables en todos los quesos HAP con respecto a los quesos elaborados con leche HTST, tanto durante su elaboración como durante el almacenamiento refrigerado. El tiempo de coagulación se incrementó en aproximadamente 10 min (40-42 min vs 30-32 min). De acuerdo a Zamora *et al* (2012b; 2007) el tratamiento HAP provoca aumento en el tiempo de coagulación, posiblemente causado por formación de complejo $\beta\text{LG}-\kappa\text{CN}$ el cual a su vez reduce la velocidad de acción de la renina por impedimento estérico de la βLG desnaturalizada; otros factores relevantes que pueden incrementar el tiempo de coagulación incluyen a la hidrólisis parcial y dispersión de κCN y la asociación con glóbulos grasos diminutos rodeados por una nueva membrana conformada por proteínas séricas desnaturalizadas y fragmentos de caseína. Posteriormente, durante el corte, la cuajada HAP fue considerablemente menos firme que la HTST y durante la agitación moderada tras el corte, los cubos de cuajada se rompían con facilidad. Esto era especialmente cierto para la leche HAP con $T_i=40^{\circ}\text{C}$, lo cual ocasionaba pérdidas extensas de cuajada en forma de finos (partículas con tamaño $<1\text{mm}$). Estas pérdidas se hacían mayores durante el prensado, dado que la cuajada era poco cohesiva y débil, y tendía a salir por los orificios del molde. La apariencia del suero separado durante estas operaciones confirmaba el argumento de que gran parte de las proteínas de suero se integraban a

la cuajada por efecto de la HAP, pues para los quesos elaborados con leche homogeneizada a ambas T_i 's, pues en lugar del color típico amarillento-verdoso, causado por presencia de globulinas, albúminas, remanentes de grasa y riboflavina, el suero era casi transparente, con notas verdosas. Aunque no se hicieron determinaciones de contenido de proteína en suero, la reducción de pérdidas de nitrógeno en suero por efecto de pretratamientos a alta P de leche se ha reportado con anterioridad tanto para tratamientos PAPH (Huppertz *et al.*, 2004c; Lopez-Fandiño *et al.*, 1996) como HAP (Zamora *et al.*, 2007) y esta misma apariencia fue reportada recientemente por Zamora *et al.* (2012b) empleando un pretratamiento de leche a 300 MPa, 30°C.

El rendimiento de los quesos HAP aumentó con T_i y el uso de PM y fue mayor al de quesos HTST (Tabla 4.5). Esto puede explicarse por una mayor desnaturalización de proteínas séricas al incrementarse T y tiempo de proceso; una vez integradas a la cuajada y debido a su naturaleza higroscópica, absorbieron una mayor cantidad de agua, de manera similar a lo reportado por Kheadr *et al.* (2002) y Guerzoni *et al.* (1999). Otros factores que pueden incidir en el incremento de rendimiento por HAP incluyen una mayor recuperación de grasa y modificaciones en la microestructura del queso que aumentan su capacidad de retención de agua (Kheadr *et al.*, 2002). Visualmente, la apariencia de la mayoría de los quesos HAP difirió de los fabricados con leche HTST, especialmente durante el almacenamiento refrigerado (Figura 4.1). De los quesos fabricados con leche HAP sólo el proveniente de leche tratada a $T_i = 20^\circ\text{C}$, un pase, fue similar a los HTST, aunque con un tono más amarillo. Los restantes presentaron características sensoriales únicas o defectos de distinta índole. El queso de leche $T_i = 20^\circ\text{C}$, PM= 3 poseía una tonalidad gris al día 1, misma que disminuyó tras 21 d de almacenamiento. Mientras tanto, los quesos de leche HAP a $T_i = 40^\circ\text{C}$, independientemente del número de PM, presentaron sinéresis intensa y grietas; esta textura abierta se relaciona con exceso de humedad e interrelaciones entre CNs, PS y GGs, las cuales causan cohesión deficiente de gránulos durante el prensado y fermentación de lactosa residual, factores que predisponen a la formación de grietas (Johnson, 2001).

TABLA 4.5 Rendimiento de quesos de leche con pases múltiples (PM) de HAP a 250 MPa y diferentes Ti

PM	Rendimiento (%)	
	Ti=20°C	Ti=40°C
1	11.09	14.92
3	12.57	17.51
HTST*	10.92±1.02	

*Promedio de cuadruplicados

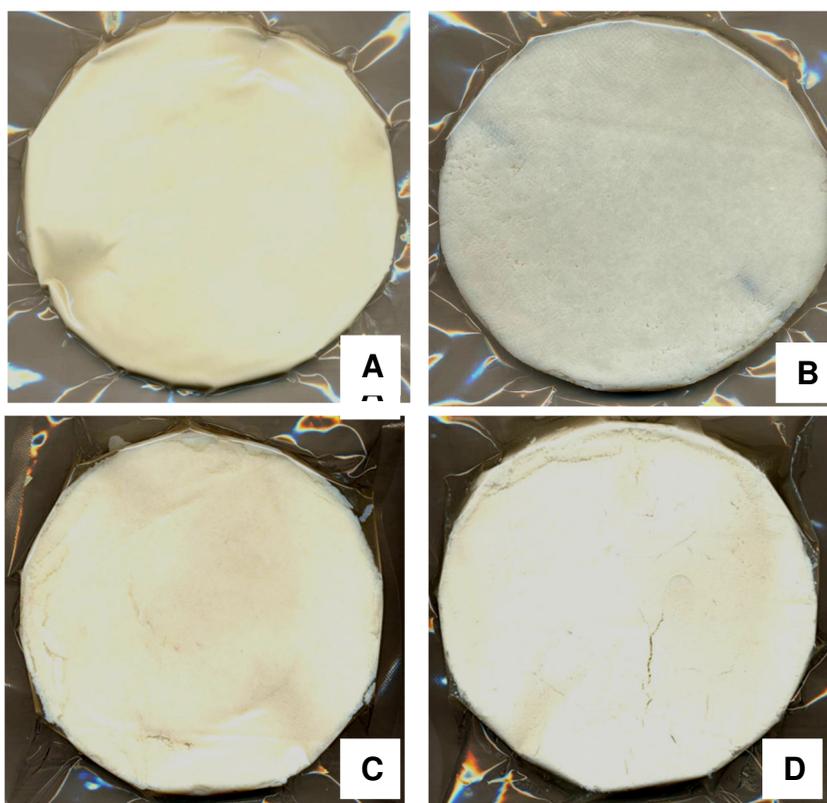


FIGURA 4.1 Quesos de leche con PM de HAP a 250 MPa a diferentes Ti, tras 10 d de almacenamiento refrigerado **A** Ti=20°C, 1 pase **B** Ti=20°C, 3 pases **C** Ti=40°C, 1 pase **D** Ti=40°C, 3 pases

Resultados y discusión

Se observaron cambios en la textura de los quesos HAP al día 1 y durante el almacenamiento refrigerado. Los resultados del análisis de perfil de textura (TPA) de los quesos (dureza, cohesividad, elasticidad) determinada al día 1 se presentan en la Tabla 4.6. El único parámetro que presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) fue dureza, que se vio afectada por T_i y el número de PM, con un mayor efecto de la primera. Los quesos elaborados con leche de $T_i = 40^\circ\text{C}$ fueron más suaves, lo cual se correlaciona con los datos de rendimiento previamente mostrados. Al comparar estos resultados con las medias de duplicados de los valores de TPA de los quesos elaborados con leche pasteurizada (dureza = 0.935 Kg, cohesividad = 0.647, elasticidad = 0.947) se consideró que éstos se asemejaban más a aquellos con $T_i = 20^\circ\text{C}$, en particular en su firmeza. Posteriormente, los quesos se almacenaron 21 d bajo refrigeración, con la finalidad de observar posibles modificaciones texturales. Sin embargo, no fue posible realizar un TPA de estas muestras debido a que, en diferente magnitud, su estructura se colapsó. Los quesos tendían a extenderse hasta tal grado, que resultó imposible tomar una muestra adecuada para este análisis. Mediante una prueba sensorial informal se pudo observar que la dureza de todos los quesos disminuyó, mientras que la cohesividad se incrementó; además, todos estos productos eran fundibles y algunos presentaban una tonalidad amarillenta intensa. La mayoría de estos cambios, que se apreciaban de mayor magnitud en los quesos con $T_i = 40^\circ\text{C}$, pueden atribuirse a reacciones proteolíticas, semejantes a la que se llevan a cabo en quesos madurados por efecto de enzimas endógenas (plasmina) y exógenas (microbianas, cuajo). Se sabe que la HAP puede acelerar la liberación de enzimas intracelulares por rompimiento de las membranas microbianas, a través de los mecanismos antes citados (cavitación, impactos de alta velocidad, cizalla) y con ello incidir sobre la actividad de enzimas hidrolíticas (Bury *et al.*, 2001). Entonces, el rompimiento celular provocado por la HAP en los microorganismos nativos de leche promovió un proceso de maduración acelerada sin adición de cultivo iniciador; este tema se estima de interés y es conveniente explorar esta posible aplicación en un proyecto posterior.

Finalmente, es importante recalcar que la vida útil de los quesos HAP se prolongó de manera notable, al menos desde el punto de vista microbiano. Después de 50 d de

Resultados y discusión

almacenamiento, no se observó crecimiento microbiano ni desarrollo de sabores y olores desagradables, relacionados con la proliferación de deteriorativos. Durante el almacenamiento refrigerado de quesos, diversos tipos de microorganismos pueden crecer, incluyendo hongos (en la superficie del queso), levaduras (particularmente cuando la superficie está húmeda) y bacterias no iniciadoras, como lactobacilos facultativos y heterofermentativos. Sin embargo, si la leche es de buena calidad, el proceso de conservación es efectivo, se siguen prácticas higiénicas durante el proceso de elaboración y se minimiza la contaminación post-proceso, el queso puede incrementar su vida útil bajo condiciones de refrigeración (Johnson, 2001). Cabe mencionar que durante los muestreos se retiró del empaque el suero expulsado por sinéresis; este fenómeno está causado por cambios en las interacciones proteicas del queso y es especialmente frecuente en productos frescos; de no hacerlo, la vida útil del queso se vería reducida.

TABLA 4.6 Análisis de perfil de textura de quesos de leche con PM de HAP a 250 MPa a diferentes Ti

N	Temperatura (°C)							
	20		40		20		40	
	Dureza (Kg)		Cohesividad		Elasticidad			
1	1.01± 0.13 ^{Aa}	0.59± 0.12 ^{Aa}	0.58± 0.09 ^A	0.47± 0.32 ^A	0.88 ± 0.18 ^{Aa}	1.31± 0.16 ^{Aa}		
3	0.94± 0.08 ^{Aa}	0.19± 0.08 ^{Bb}	0.37± 0.11 ^A	0.88± 0.39 ^A	1.16± 0.02 ^{Aa}	1.16± 0.22 ^{Aa}		

N= Número de pases

Superíndices diferentes en mayúscula en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Superíndices diferentes en minúscula en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

De acuerdo a los resultados de las pruebas preliminares, se seleccionó la Ti de 20°C para todos los procesos HAP implementados a partir de este punto, debido al daño irreversible que podía causar el uso de Ti mayores sobre las capacidades tecnológicas de ésta para elaborar queso. Tomando en cuenta que el uso de PM era esencial para lograr la inocuidad de leche, se exploraron a continuación condiciones

de pasteurización por PM de HAP a $P \leq 250$ MPa que resultaran equivalentes a las de un proceso HTST desde el punto de vista microbiológico, como pretratamiento de leche para elaboración de queso.

4.2 Estudio de reducción de carga microbiana en leche mediante pases múltiples de HAP

La leche generalmente se trata térmicamente como pretratamiento para elaborar queso; sin embargo, se pueden presentar ciertas modificaciones nutrimentales, sensoriales y de carácter tecnológico como consecuencia del tratamiento térmico. En consecuencia, algunas alternativas no térmicas, como el HAP (Zamora *et al.*, 2012b; Lanciotti *et al.*, 2006) actualmente se encuentran bajo estudio. Como parte de los criterios científicos requeridos para asegurar la equivalencia de los procesos HAP con respecto a la pasteurización térmica se requiere determinar la reducción que estos tratamientos pueden causar sobre el patógeno identificado como el más barorresistente (*S. aureus*) y sobre la flora nativa de leche. De acuerdo a la información previa, se exploraron tratamientos de PM de HAP para definir condiciones de operación optimizadas, capaces de disminuir 5 ciclos logarítmicos tanto de microorganismos deteriorativos, expresados como BMA's, como de *S. aureus*. El método de optimización empleado fue el de superficies de respuesta. La metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es un método matemático de optimización que explora la influencia de diversas variables explicativas sobre una o varias respuestas (Bas y Boyaci, 2007). El objetivo entonces fue investigar la reducción de flora deteriorativa en leche cruda y del patógeno más barorresistente inoculado en leche UHT y desarrollar a través de RSM un modelo de optimización de respuesta múltiple como una aproximación preliminar para definir condiciones de HAP equivalentes a las de pasteurización térmica desde el punto de vista microbiológico. Es importante recalcar que la reducción microbiana atribuible al calentamiento concomitante se minimizó dado que la leche se enfrió rápidamente al salir de la válvula de AP. Aunque la temperatura máxima real que alcanzó no pudo ser determinada, dado que el equipo empleado no cuenta con un termopar localizado inmediatamente

Resultados y discusión

a la salida de la válvula de AP, la temperatura antes de la válvula de baja presión no se incrementó por encima de 40°C, aún a la máxima P de operación (250 MPa). De acuerdo a Picart *et al.* (2006) la T de la leche aumenta 16-44°C como resultado de tratamientos HAP a 100-250 MPa; por su parte, Pereda *et al.* (2007) y Thiebaud *et al.* (2003) reportan incrementos lineales de T en el rango de 18.5-19.15°C por cada 100 MPa en leche tratada por HAP en el rango de P de 100 a 300 MPa. Considerando que en esos reportes se empleó un equipo muy similar (Stansted ®, con doble intensificador), se supone que en esta investigación la leche alcanzó una T final en el rango de 64-67°C. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Grácia-Juliá *et al.* (2008) con un equipo idéntico y trabajando con una dispersión de proteínas séricas en medio acuoso el tiempo de residencia a esa T se estima debió ser <1 s (~0.2 s a la T máxima, y ~0.5 s adicionales hasta el enfriamiento a T ambiente) y, por tanto, el impacto del incremento de T sobre la reducción de carga microbiana y sobre los cambios nutrimentales, sensoriales y funcionales de leche se considera despreciable.

Los valores de promedio de grasa, proteína y pH en la leche cruda fueron $2.99 \pm 0.04\%$, $2.71 \pm 0.02\%$ y 6.67 ± 0.02 , respectivamente. Las cuentas de BMA's, por su parte, estuvieron en el rango de 5.5×10^4 a 1.2×10^5 UFC/mL.

En la Tabla 4.7 se muestran las reducciones en BMAs de leche cruda por PM de HAP. La letalidad del proceso se incrementó con P y el número de pases (N). Los resultados del ANOVA de doble vía (ver Anexo 2G) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos los niveles explorados tanto de P como de PM. Los tratamientos de PM de HAP con 3 y 5 pases provocaron disminuciones de < 5.0 y > 5.0 \log_{10} de UFC, respectivamente. La reducción de BMAs fue mayor en este estudio que la observada por Picart *et al.* (2006) con procesos HAP de un solo paso a niveles similares de P (100-300 MPa) y T_i (24°C) En ese reporte, se lograron disminuciones de BMAs del orden de 0.7, 1.7, 2.3 y 2.9 \log_{10} con procesos a 100, 200, 250 y 300 MPa, respectivamente. En esta investigación, las cuentas de BMAs disminuyeron 3.5 \log_{10} con un solo pase a 250 MPa (Tabla 4.7). Una inhibición microbiana similar fue reportada por Pereda *et al.* (2007) para UHPH a 300 MPa y $T_i = 40^\circ\text{C}$, aunque fue más alta en comparación con tratamientos HAP a PM de estudios previos. Por ejemplo,

Resultados y discusión

Picart *et al.* (2006) produjeron una reducción de 3 log₁₀. Estos resultados se comprobaron mediante de BMAs en leche cruda a través de tres pases de HAP a 200 MPa, con Ti de 24°C. Estas disimilitudes pueden atribuirse a diferencias en la microbiota nativa de leche cruda o a la eficiencia del enfriamiento después de las etapas de homogeneización.

Como en las pruebas con BMAs, la tasa de reducción de *S. aureus* se incrementó con P y N (Tabla 4.8). La mayor reducción se obtuvo con 5 pases a 250 MPa (6.1 log₁₀) mientras que con 3 pases a la misma P y con cinco pases a 175 MPa se logró una reducción superior a 4.0 log₁₀ (4.9 y 4.2, respectivamente).

TABLA 4.7 Reducciones observadas (Obs) y predichas (Pred) de BMAs por HAP a presiones (P) y número de pases (N) específicos

P (MPa)	Factor de reducción log₁₀ (S)					
	N=1		N=3		N=5	
	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†
100	-0.09±0.03 ^{Aa}	-0.40	-1.49±0.18 ^{Ab}	-1.33	-2.08±0.04 ^{Ac}	-2.25
175	-2.24±0.11 ^{Ba}	-2.04	-3.84±0.03 ^{Bb}	-3.25	-4.39±0.17 ^{Bc}	-4.47
250	-3.51±0.22 ^{Ca}	-3.68	-4.90±0.26 ^{Cb}	-5.18	-6.65±0.06 ^{Cc}	-6.68

*Los valores son medias ± DE (n=4)

†Valores calculados empleando la Ec.14 con P y N dados

Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa p=0.05

Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa a p=0.05

Con todos los tratamientos restantes se redujeron menos de 3.0 log₁₀, procesos que no podían considerarse microbiológicamente seguros para la producción de leche fluida o subproductos lácteos. El ANOVA de doble vía correspondiente (ver Anexo 2H) muestra que tanto los factores principales como su interacción fueron significativos (p =0.05). La P tuvo el mayor efecto, seguido de N. Aunque la interacción refleja un efecto sinérgico entre los factores principales, su significancia fue comparativamente baja. Se

Resultados y discusión

obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) para P y N entre los tratamientos en el rango medio-bajo (P=100, 175 MPa; uno, tres pases) y el de más alta intensidad (P=250 MPa; cinco pases) (Tabla 4.8).

La tasa de reducción de *S. aureus* está en concordancia con resultados reportados en numerosos trabajos previos (Vachon *et al.*, 2002; Picart *et al.*, 2006; Donsi *et al.*, 2009); los tratamientos HAP de un solo pase mostraron una tendencia similar a lo reportado por López-Pedemonte *et al.* (2006) y Briñez *et al.* (2007). Como se mencionó, el alcance de la reducción del HAP se incrementa con P (Diels y Michiels, 2006). La reducción de *S. aureus* por PM de HAP están en concordancia con lo reportado por Wuytack *et al.* (2002) en buffer de fosfatos, dado que la letalidad se incrementó de $< 1.0 \log_{10}$ con un solo pase a 250 MPa/ 45°C hasta cerca de $4.0 \log_{10}$ con cuatro pases de HAP.

TABLA 4.8 Reducciones observadas (Obs) y predichas (Pred) de *S. aureus* por HAP a presiones (P) y número de pases (NP) específicos

<i>P</i> (MPa)	Factor de reducción \log_{10} (<i>S</i>)					
	N=1		N=3		N=5	
	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†
100	-0.64±0.14 ^{Aa}	-0.68	-1.28±0.06 ^{Aa}	-1.09	-2.21±0.03 ^{Ab}	-2.70
175	-1.36±0.01 ^{Aa}	-1.14	-2.18±0.18 ^{Aa}	-1.75	-4.19±0.36 ^{Ab}	-3.78
250	-2.76±0.27 ^{Ba}	-3.44	-4.92±0.05 ^{Ba}	-4.44	-6.07±0.13 ^{Bb}	-6.26

*Los valores son medias \pm DE (n=4)

†Valores calculados empleando la Ec. 15 con P (MPa) y N dados

Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa $p=0.05$

Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa a $p=0.05$

Nuevamente, se obtuvieron mayores tasas de reducción en esta investigación ($5.0-6.0 \log_{10}$ con tres y cinco pases a 250 MPa) a pesar de emplear leche entera y una

Ti menor (25°C). Dado que no se observó un efecto protector de la matriz alimenticia empleada sobre la resistencia microbiana a la HAP, como ha sido propuesto previamente (Vachon *et al.*, 2002), las diferencias en la efectividad de los PM de HAP sobre la reducción en cuentas de *S. aureus* en PBS y leche inoculada puede atribuirse bien a factores microbianos (cepa, fase de crecimiento) o a variables relacionadas con el equipo, como el diseño de la válvula de homogeneización (Diels y Michaels, 2006).

Adicionalmente, se estudió la sobrevivencia de coliformes nativos de leche a los tratamientos de HAP implementados; asimismo, dado que los coliformes son microorganismos indicadores, el recuento permitió evaluar la posibilidad de ocurrencia de una contaminación cruzada asociada con el uso de PM. La resistencia de coliformes a HAP es baja; Pereda *et al.* (2007) reportan eliminación completa de coliformes ($N_0=3.5 \log_{10}$) en leche a $P>100$ MPa. Las cuentas iniciales de coliformes en este estudio estuvieron en el rango de $2.25 \times 10^3 - 6.45 \times 10^4$. Los resultados de la reducción de coliformes se muestran en la Tabla 4.9. El ANOVA de doble vía correspondiente indica un efecto significativo ($p<0.05$) de P y NP sobre la reducción microbiana, la cual se incrementó con la P en todos los niveles explorados; por otra parte, las cuentas de coliformes disminuyeron al incrementarse del NP de 1 a 3, pero aumentaron nuevamente al aplicarse 5 pases de HAP, lo cual refuerza la idea de que el uso de recirculaciones implica un mayor riesgo de recontaminación post proceso. Aunque la presencia post-proceso de coliformes en si misma no implica la existencia de microorganismos patógenos en el producto, si existe una asociación entre ambas (Goff, 2013), y por tanto, las medidas higiénicas y las buenas prácticas de manufactura deben reforzarse si el uso de PM de HAP es requerido.

Para la modelación matemática, únicamente se tomaron en cuenta los datos de reducciones de BMAs y *S. aureus*. No se requirió transformación de los datos de reducción \log_{10} de BMAs, mientras que se calculó el inverso de la respuesta positiva de la reducción \log_{10} de *S. aureus* para lograr minimizar la suma del cuadrado de los errores. En ambos casos, se aplicaron modelos polinomiales de segundo orden como función de aproximación para evaluar los efectos individuales, interactivos y

cuadráticos de P y NP sobre la reducción de cuentas microbianas. El modelo cuadrático se expresó en la Ec. 14 como:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Ec. 14})$$

donde Y es la variable de respuesta; x_i y x_j son las variables independientes; b_0 , b_i , b_{ii} , y b_{ij} son los coeficientes de regresión para el intercepto y términos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente. Cabe señalar que, para propósitos de modelación, NP se consideró una variable discreta.

TABLA 4.9. Reducción de cuentas de coliformes en leche entera cruda tratada por HAP a presiones (P) y número de pases (NP) específicos

P (MPa)	Factor de reducción \log_{10} (S)		
	N=1	N=3	N=5
100	-1 ± 0.81 ^{Aa}	-2.13 ± 0.69 ^{Ab}	-1.08 ± 1.53 ^{Ab}
175	-1.45 ± 0.97 ^{Ba}	-3.17 ± 0.52 ^{Bb}	-2.83 ± 0.12 ^{Bb}
250	-3.04 ± 0.74 ^{Ca}	-4.68 ± 0.15 ^{Cb}	-4.68 ± 0.15 ^{Cb}

Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Posteriormente, las variables no significativas ($p < 0.05$) fueron eliminadas una por una, mediante la aplicación de una regresión por eliminación hacia atrás (Minitab 16.0; Minitab Inc., State College, PA), calculando el conjunto de parámetros que minimizaran la suma del cuadrado de los errores (SSE). Para cada caso, el ajuste del modelo correspondiente se evaluó mediante el coeficiente de determinación ajustado ($\text{adj } R^2$) y se verificó que las gráficas de residuales vs. valores ajustados tuvieran una distribución normal y varianza constante (Ver sección de Anexos). El análisis de regresión resultó en la eliminación de las variables de segundo orden de las

Resultados y discusión

expresiones cuadráticas tanto para la reducción \log_{10} de BMAs como la de *S. aureus*, aunque P, NP y su interacción fueron significativas ($p=0.05$).

La Ecuación 15 (Ec. 15) se obtuvo para modelar el nivel de reducción \log_{10} de BMAs por pases múltiples de HAP, con un valor de SSE = 0.2981.

$$S = 2.0652 - 0.0200 P - 0.2737 N - 0.0019 PN \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde:

S= Reducciones de ciclos \log_{10}

P= Presión (MPa)

N= Número de pases

Se obtuvo un valor alto de adj. R^2 (0.981), sin señales de desviaciones de los supuestos del modelo, de acuerdo a la gráfica de residuales vs. valores ajustados, la cual presentaba una distribución aleatoria de los residuales y no mostraba ningún patrón sistemático. En la Tabla 4.6 se puede observar un ajuste apropiado entre los valores observados y predichos. La Figura 4.2a muestra la gráfica de contorno generada a partir del modelo de reducción de cuentas de BMAs, ajustado para condiciones de proceso que representan la misma tasa de disminución a magnitudes específicas de S, y en particular del valor de reducción buscado (5 \log_{10}). Los tratamientos de PM de HAP que fueron capaces de alcanzar esta disminución de BMAs en leche cruda fueron 5 pases de 196 MPa y 4 pases de 215 MPa.

Por otra parte, y de manera equivalente, se obtuvo la Ecuación 16 para modelar la disminución en cuentas de *S. aureus* por tratamientos de PM de HAP, la cual presentó un valor de SSE=0.1436

$$S = 1 / (0.0094 P + 0.4327 N - 0.0016 P*NP - 2.6732) \quad (\text{Ec. 16})$$

Donde

S= Reducciones de ciclos \log_{10}

P= Presión

N= Número de pases

Resultados y discusión

Al igual que en el modelo de BMAs, el coeficiente de determinación ajustado fue razonablemente alto (Adj. $R^2 = 0.896$) y los supuestos del modelo se verificaron de forma análoga al caso anterior. Nuevamente, el modelo se consideró apropiado para describir la disminución en cuentas del microorganismo de interés (*S. aureus*) en el rango de valores explorado, lo cual se corroboró al comparar los valores observados y predichos (Table 4.8). En la Figura 4.2B se muestra la gráfica de contorno generada mediante el modelo propuesto, ajustada a condiciones equivalentes de reducción microbiana ($S=3-5$). Se observa un incremento en la magnitud de la disminución de cuentas microbianas con el aumento de presión y número de pases. Asimismo, se pudo observar un efecto aditivo de la aplicación de PM; así, por ejemplo, la disminución en cuentas aplicando un pase de 250 MPa era similar al de cinco pases de 100 MPa. Los procesos HAP de cuatro pases a 239 MPa y cinco pases a 208 MPa son los mínimos requeridos para lograr una disminución de $5 \log_{10}$ en la población de *S. aureus* en leche entera.

Empleando las Figuras 4.2A y B se construyó una gráfica traslapada de contorno, la cual fue usada para determinar condiciones optimizadas de HAP que permitieran la reducción de $5 \log_{10}$ de ambos grupos de microorganismos estudiados. Sin embargo, dado que los parámetros requeridos para producir una reducción en las cuentas microbianas siempre fueron mayores para *S. aureus* que para BMAs, las condiciones óptimas podían obtenerse directamente de la Figura 4.2A. Tomando esto en cuenta, se definieron los parámetros HAP que se utilizarían en las etapas subsecuentes del trabajo.

Se estima que una reducción aceptable de cuentas de microorganismos deteriorativos en varios tipos de productos alimenticios es de cinco ciclos logarítmicos (5S). Sin embargo, la letalidad de los procesos HAP de un solo pase rara vez excede 4S cuando se aplica en matrices como leche (López-Pedemonte *et al.*, 2006). De hecho, no se encontró reporte en la literatura sobre tratamientos de HAP de un solo pase capaces de producir una reducción 5S en las cuentas de BMAs de leche cruda. Pereda *et al.* (2007) sugirieron que un tratamiento a 300 MPa con $T_i = 30^\circ\text{C}$ era una alternativa viable de pasteurización/ homogeneización simultánea de leche, dado que

la vida de anaquel del producto fue similar a la del tratamiento térmico empleado como control (90°C, 15 s); sin embargo, la reducción de BMAs que lograba ($S=3.2$) no se acercaba a 5S. Por su parte, Smiddy *et al.* (2007) reportaron una disminución de 5S en BMAs de leche cruda con un solo pase de HAP a 200 MPa, aunque tomando en cuenta el rango de valores de T_i utilizado (55-70°C) se considera que prevalecieron los efectos térmicos sobre los mecánicos en la reducción microbiana observada.

Uno de los problemas principales a los que se enfrentan las tecnologías emergentes para ser aplicadas en el ámbito industrial es la falta de identificación de factores intrínsecos al producto que puedan funcionar como indicador de eficiencia de proceso. Como se ha mencionado anteriormente, para leche HTST el indicador de tratamiento térmico es la enzima FA, la cual exhibe una termorresistencia similar a la de *C. burnetii*, microorganismo de referencia para la definición de parámetros T/t de pasteurización. Sin embargo, estos indicadores de proceso aún no se identifican con claridad para HAP; así, se desconoce si una enzima endógena o componente nativo de leche presenta una barorresistencia similar a la de *S. aureus* y, por lo mismo, no se ha desarrollado una prueba rápida que permita sustituir el conteo de sobrevivientes de este microorganismo tras el proceso de homogeneización. Sin embargo, dado que la HAP produce una elevación de la T del fluido procesado como consecuencia del calentamiento adiabático durante la compresión y el paso por la válvula, se han evaluado indicadores de tratamiento térmico para garantizar la inocuidad, como FA (Hayes *et al.*, 2005), y de daño térmico como formación de hidroximetilfurfural, compuestos de color, lactulosa, etc. (Pereda *et al.*, 2009). Al igual que en la primera etapa, se evaluó la actividad de FA mediante una prueba cualitativa en el entendido que, de resultar negativa, representaría que los procesos HAP seleccionados produjeron un calentamiento acumulado equivalente o superior al logrado con un tratamiento térmico HTST estándar. Los resultados de dicha prueba, realizados por duplicado y comprobados por inspección visual, indicaron que sólo los tratamientos a 250 MPa con 3 y 5 pases presentaron una reacción negativa para FA, determinado mediante la permanencia de un color café rojizo típico del fenilfosfato de sodio en solución. Por otra parte, el tratamiento de 5 pases a 175 MPa resultó en una reacción

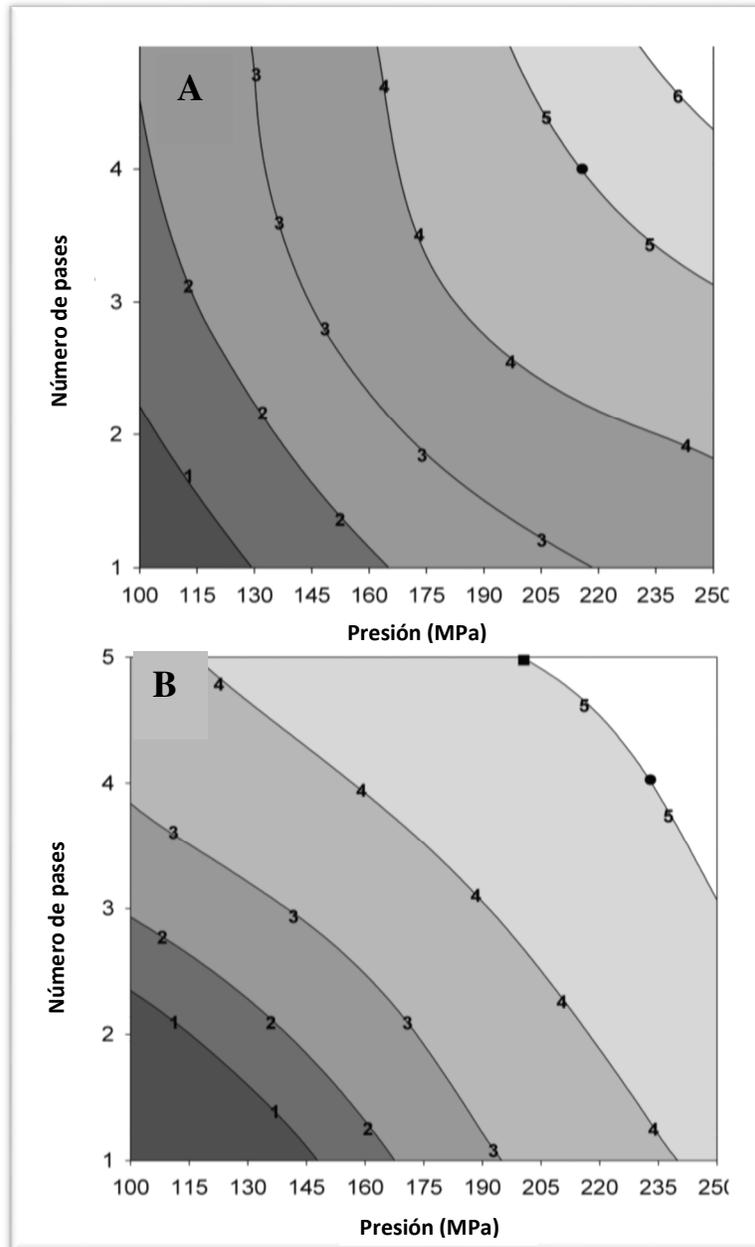


FIGURA 4.2 Gráficas de contorno para reducción predicha por HAP de **(A)** BMAs, ajustada para condiciones de reducción equivalente a rangos específicos de S. S=5 con ●N=4 a P=215 MPa ■ N=5 a P=196 MPa **(B)** *S. aureus*, ajustada para condiciones de reducción equivalente a rangos específicos de S. S=5 con ●N=4 a P=232 MPa ■ N=5 a P=202 MPa

levemente positiva observable por el desarrollo de un matiz ligeramente azul provocado por la liberación de una cantidad moderada de fenol. El resto de los tratamientos presentaron una reacción fuertemente positiva. Estos resultados demuestran el efecto aditivo de los PM sobre la inactivación de FA; al repetir esta prueba cualitativa con leche tratada de acuerdo a las condiciones optimizadas, el resultado fue nuevamente negativo.

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos HAP pueden afectar a diversos componentes de leche incluyendo micelas de caseína, proteínas séricas y glóbulos de grasa, especialmente a $P > 200$ MPa. Las condiciones optimizadas definidas en este trabajo (240 MPa/ cuatro pases; 210 MPa/ cinco pases) son capaces de reducir las cuentas de patógenos y deteriorativos de leche cruda en magnitudes mayores a 5.0 \log_{10} . Aunque se ha observado que los PM pueden constituir una limitante para implementar un proceso HAP a escala industrial y que podrían obtenerse resultados equivalentes en términos de reducción microbiana sustituyendo los PM por Tis más elevadas, tales condiciones pueden limitar las capacidades tecnológicas de la leche para elaborar productos derivados, debido a una mayor desnaturalización térmica de proteínas séricas (Hayes *et al.*, 2005). Por tanto, se pueden seleccionar combinaciones apropiadas de P/PM para procesar leche cuando el uso de Tis elevadas puedan causar cambios funcionales importantes en ésta los cuales pueden ser incompatibles con el uso final previsto para el producto (por ejemplo, para elaboración de variedades selectas de queso).

De manera paralela a las determinaciones microbiológicas descritas se repitió un conjunto de experimentos bajo condiciones idénticas para evaluar la capacidad de leche sometida a tratamientos a PM de HAP para elaborar queso empleando pruebas predictivas apropiadas. Los resultados de evaluación de tiempo de coagulación por renina (TCR) y rendimiento potencial se muestran en la Tabla 4.10. El TCR y el rendimiento se expresan como porcentajes de ambas variables en relación a los observados en el testigo (Zobrist *et al.*, 2005)

TABLA 4.10. Cambios porcentuales en tiempo de coagulación por renina (TCR) y rendimiento potencial (RP) de leche tratada por PM de HAP vs leche cruda

		Presión (MPa)			
		Pases	100	175	250
TCR (%)*	1		59.90 ± 2.52 ^{Aa}	58.50 ± 1.36 ^{Aa}	62.42 ± 0.50 ^{Aa}
	3		64.24 ± 1.02 ^{Aa}	53.60 ± 0.25 ^{Bb}	75.00 ± 3.66 ^{Bc}
	5		63.12 ± 0.18 ^{Aa}	52.27 ± 0.66 ^{Bb}	79.98 ± 2.17 ^{Bc}
		HTST		138.40 ± 7.77	
RP (%)*	1		116.41 ± 9.45 ^{Aa}	118.33 ± 0.81 ^{Aab}	127.16 ± 1.26 ^{Ab}
	3		111.54 ± 2.05 ^{ABa}	122.57 ± 1.75 ^{Ab}	129.70 ± 0.98 ^{Ac}
	5		123.19 ± 3.72 ^{Aab}	118.28 ± 4.96 ^{Ab}	130.47 ± 1.17 ^{Aa}
		HTST		99.84 ± 2.43	

*N=4; el cambio porcentual se refiere al incremento/disminución del parámetro en función del observado en leche cruda

**Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa; minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

Como puede observarse en la Tabla 4.10 todos los tratamientos a PM de HAP produjeron una reducción en el TCR con relación al observado en leche cruda. Por su parte, la pasteurización HTST incrementó sustancialmente este factor, el cual representó un aumento del 38% sobre el observado en LC y, con excepción de los tratamientos a 250 MPa con 3 y 5 pases, al menos duplicó el tiempo requerido para coagular leche HAP. En términos generales, se sabe que un TCR reducido como resultado del método de Berridge o de pruebas análogas indica por lo regular una buena formación potencial de gel y una firmeza adecuada de gel tras un tiempo estándar de coagulación (Law y Tamime, 2010). La disminución en el tiempo de coagulación enzimática de leche tratada a AP se ha reportado con anterioridad. Empleando el mismo método que el aquí reportado, Zobrist *et al.* (2005) obtuvieron reducciones del TCR de 20 y 30% del observado en leche cruda al presurizar leche a 250 y 100 MPa, respectivamente. Por su parte, Zamora *et al.* (2007) encontraron que el TCR disminuyó a 73% y 69.7% al aplicar un pase de HAP a 100 y 130 MPa, respectivamente; sin

Resultados y discusión

embargo, al incrementar P a 200 y 230 MPa, TCR aumentó nuevamente a 93 y 94.5% del valor de leche cruda. Comparativamente, el TCR de leche HTST sólo aumentó aproximadamente 3%; todas estas determinaciones se llevaron a cabo empleando un instrumento infrarrojo que mide variaciones en la cantidad de energía absorbida por la leche al coagular; como referencia, Zamora *et al.* (2012b) reportan un incremento de 28% de TCR al comparar leche HAP (300 MPa, 30°C) con leche pasteurizada (80°C, 15 s). La variación en las magnitudes de cambio en TCR se atribuye al uso de diferentes métodos de medición. De manera similar a lo descrito en los trabajos antes mencionados, los tratamientos de un solo pase a 100 y 175 MPa redujeron TCR significativamente en ~40%; además, la aplicación de PM a 100 MPa no afectó TCR, mientras que a 175 MPa lo disminuyó significativamente, hasta alcanzar el menor tiempo de coagulación de entre todas las combinaciones probadas con 5 pases (52.27% del TCR de leche cruda). Asimismo, el HAP a 250 MPa produjo un aumento en TCR, mismo que se acentuó con el uso de PM, hasta alcanzar el mayor TCR con 5 pases (~80% del de leche cruda). Este comportamiento se puede explicar en función de las alteraciones microestructurales que provoca el HAP, específicamente en términos de desnaturalización de PS y cambios en el equilibrio mineral. Se sabe que condiciones selectas de HAP pueden provocar un rompimiento de los aglomerados de fosfato de calcio coloidal, el cual pasa a fase soluble; por ejemplo, Roach y Harte (2008) reportan un incremento considerable en la concentración de Ca^{2+} al subir la P de homogeneización por encima de 250 MPa (de 130 a 150 mg/L), con un máximo de concentración a 300 MPa (aprox. 165 mg/L). De acuerdo a Walstra *et al.* (2006), la coagulación de micelas previamente hidrolizadas por renina depende de varios factores, destacando la concentración de calcio iónico, el cual favorece su acercamiento por neutralización de carga y sirve como un puente que promueve el entrecruzamiento de micelas con formación de residuos serina-fosfato. La aplicación de PM de HAP permite que la concentración de calcio soluble aumente y posibilita alcanzar una concentración crítica en menor tiempo. Sin embargo, los procesos con PM de HAP conllevan cambios importantes en las estructuras proteicas, sobre todo, las menos barorresistentes, como BLG; este fenómeno se tratará a profundidad en la siguiente sección. Los tratamientos de conservación de leche bajo condiciones que pueden causar desnaturalización de

BLG, posibilitando su interacción con KCN a través de interacciones sulfhidrilo-disulfuro afectan considerablemente el proceso de coagulación e impiden su agregación para formar una estructura apropiada de gel (Fox *et al.*, 2000). Por tanto, se asume que, a pesar del aumento en la concentración del calcio iónico causado por la HAP, las condiciones más intensas de proceso (250 MPa, especialmente a PM=3,5) desnaturalizaron BLG hasta tal magnitud que el TCR empezó a incrementarse nuevamente.

En la misma Tabla 4.10 se muestran los cambios de rendimiento potencial (RP) de leche tratada por PM de HAP comparado con los observados en leche cruda y HTST. El RP de éstas últimas no varió significativamente entre sí ($\alpha=0.05$), mientras que todos los procesos HAP, a un solo pase y a PM incrementaron significativamente el RP, en particular todos los tratamientos a 250 MPa y el de 5 pases a 100 MPa, cuyos promedios estuvieron en el rango de 123 -130% del correspondiente a leche cruda. Se sabe que la magnitud del proceso HAP, la cual se incrementa con la P y el NP puede afectar el grado de desnaturalización proteica, la cual está ligada con la capacidad de retención de agua y el incremento de recuperación de PS por formación de complejos con KCN.

Los resultados de esta sección muestran que los PM de HAP pueden constituir una alternativa viable para procesar leche a utilizarse como materia prima para la producción de queso, dado que parámetros selectos de P y número de pases pueden asegurar su inocuidad microbiológica y brindar beneficios potenciales en sus características tecnológicas, incluyendo un tiempo reducido de coagulación y un incremento en el rendimiento, con los beneficios operativos y económicos que esto representa.

4.3 Determinación de cambios fisicoquímicos en leches HAP y HTST

Las condiciones teóricas de proceso definidas en la etapa previa como adecuadas para garantizar la inocuidad (208 MPa, 5 pases; 239 MPa, 4 pases) fueron levemente ajustadas al implementarse en experimentos reales debido a limitaciones en el uso del equipo. Inicialmente, se redondearon las magnitudes de P a la decena siguiente; así,

el proceso de 5 PM se realizaría a 210 MPa y el de 4 PM a 240 MPa. Sin embargo, resultó imposible mantener este último nivel de P pues al operarse el equipo a una P cercana a la limitante (250 MPa) éste tendía a incrementarse casi inmediatamente después de iniciado el proceso hasta alcanzar este nivel limitante tras un $t < 1$ min. Debido a este inconveniente, las condiciones reales de proceso fueron 5 pases a 210 MPa y 4 pases a 250 MPa. Tomando esto en cuenta se estableció un nuevo conjunto de experimentos de HAP (250 MPa, 4 PM; 210 MPa 5PM) y HTST de leche bovina entera (3% de grasa, con razón proteína: grasa de 0.88 ± 0.01) para evaluar la influencia de dichos procesos de conservación sobre propiedades fisicoquímicas que pudieran influir sobre la capacidad tecnológica de la leche para producir queso. Los cambios más relevantes se discuten a continuación.

La evolución del pH de leche bovina con PM de HAP a diferentes P de operación se muestra en la Figura 4.3. Como puede observarse, el pH de leche HTST presentó un valor promedio de 6.71 ± 0.01 , lo cual es un leve incremento con relación al de leche cruda (6.66 ± 0.01). El pH de leche depende de múltiples factores, tanto intrínsecos (p.e. composición, estado de dispersión y grado de disociación mineral; concentración de ácidos grasos libres) como extrínsecos (historial térmico, fermentación de lactosa). Se ha demostrado que el tratamiento térmico, aún uno de baja intensidad como la pasteurización, es capaz de disminuir el pH de leche a través de un cambio en el equilibrio mineral de calcio, el cual pasa de formas ionizada y soluble a coloidal, con liberación de H^+ a la fase acuosa (Walstra *et al.*, 2006). Sin embargo, este fenómeno es reversible, y la T a la que se realiza la prueba es determinante para la magnitud de la medición. El pH es altamente dependiente de la temperatura; a $25^\circ C$, se encuentra en un rango de 6.5 a 6.7, aunque a $T < 10^\circ C$ puede incrementarse hasta valores cercanos a 7 y a $T > 80^\circ C$ puede disminuir hasta $pH = 6$ (Bhandari y Singh, 2011). Considerando que la leche HTST se enfrió inmediatamente tras completar el tratamiento térmico, el pequeño incremento observado en el pH pudo deberse a diferencias en temperatura de medición con respecto a la leche cruda. Por su parte, el

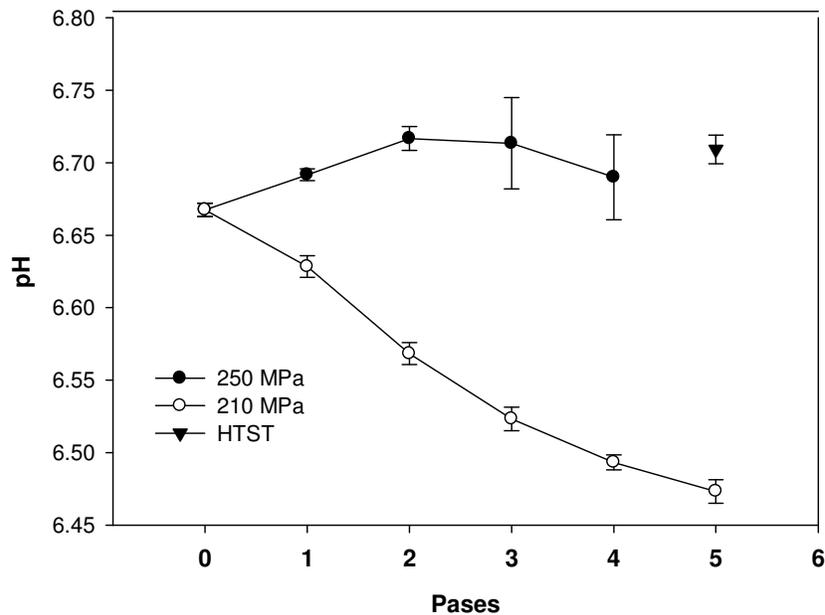


FIGURA 4.3 Evolución de pH en leche entera cruda tratada por pases múltiples de homogeneización a alta presión en comparación con leche pasteurizada

el comportamiento del pH varió significativamente ($\alpha=0.05$) con respecto a la magnitud de P aplicada y con el NP de HAP. El tratamiento a PM de 250 MPa no cambió el valor de pH; en particular, a 3 o más PM, su magnitud no exhibía diferencias significativas con el valor de leche HTST. Por su parte, el tratamiento HAP a 210 MPa disminuyó significativamente el valor de pH con cada pase de alta presión, hasta alcanzar un $\text{pH}=6.47\pm 0.01$ tras 5 pases. Estos resultados se asemejan a los reportados en otros trabajos que utilizaron rangos similares de P. Hayes y Kelly (2003a) reportan una disminución del pH de leche entera bovina cruda de 6.70 a 6.52 tras ser sometida a un proceso de HAP de un solo pase a 210 MPa; este comportamiento se atribuyó a una actividad incrementada de lipasa lipoproteica por incremento del área disponible de reacción en los glóbulos grasos. Pereda *et al.* (2007) observaron una disminución significativa, aunque de poca magnitud, en el pH de leche cruda (6.74) al homogeneizarse a 200 MPa con $T_i=30^\circ\text{C}$ (6.72), mientras que procesos HAP a mayor P (300 MPa) o $T_i=40^\circ\text{C}$ no lo alteraron significativamente. Por su parte, Zamora *et al.*

(2012a) indicaron que un proceso a 300 MPa, 30°C incrementó significativamente el pH de leche HAP (6.66 ± 0.04) en comparación con aquel obtenido por pasteurización/homogeneización de baja intensidad (6.59 ± 0.02). Previamente, Zamora *et al.* (2007) observaron un efecto diferenciado de la P sobre el pH; a P en el rango de 100-200 MPa, HAP's con $T_i=30^\circ\text{C}$ provocaron una disminución de hasta 0.24 unidades de pH en relación con las leches cruda y pasteurizada, mientras que tratamientos a $P=300$ MPa no causaron un cambio significativo en este parámetro, de manera análoga a los procesos a PM de HAP a 250 MPa realizados en este trabajo. Esta diferencia se explicó como un balance entre los efectos de P y del incremento concomitante de T sobre el equilibrio mineral. Los rangos bajos de P causan un rompimiento parcial de la micela de caseína y provocan una transferencia de calcio y fosfato inorgánico de la fase micelar a la soluble; mientras tanto, en los rangos elevados de P el efecto de T equilibra el estado de dispersión de los minerales a través de una transferencia de la fase soluble a la coloidal y, por tanto, el pH no cambia sensiblemente.

En la Tabla 4.11 se muestran los cambios en los parámetros triestímulo de color en leche tratada por PM de HAP a 210 y 250 MPa. El color típico de leche resulta de la dispersión de luz provocada por partículas coloidales como micelas de caseína y glóbulos grasos. La dispersión de luz ocurre cuando la longitud de onda de ésta se encuentra en el mismo orden de magnitud de la partícula. Esto implica que partículas más pequeñas dispersan luz a longitudes de onda más cortas; por ello, procesos que afecten el tamaño promedio de estas partículas son capaces de modificar su color en distinta magnitud. Tal es el caso de la homogeneización convencional (Fox y McSweeney, 1998). Sin embargo, a diferencia de esta última, la HAP es capaz de producir emulsiones más finas por mayor disminución del tamaño promedio del glóbulo graso (Thiebaud *et al.*, 2003) y, bajo condiciones selectas, de P y NP, disminuir el tamaño de micelas de caseína (Sandra y Dalgleish, 2005). Se han reportado una disminución en luminosidad e incrementos en tonalidades verdes (a^-) y amarillas (b^+) en leche bovina y ovina PAP (Gervilla *et al.*, 2001; Mussa y Ramaswamy, 1997); por su parte, para leche HAP, el efecto del tratamiento es similar para el parámetro a y en

TABLA 4.11. Cambios de parámetros de color en leche entera cruda tratada por HAP a presión (P, MPa) y número de pases (N) específicos

N/P	L		a		b	
	210	250	210	250	210	250
0*	68.31±0.18 ^A		-3.31±0.06 ^A		-0.74±0.23 ^A	
1	72.64±0.8 ^{Ba}	71.76±0.7 ^{Ba}	-3.88±0.4 ^{Aa}	-4.33±0.1 ^{Ba}	-1.85±0.37 ^{Ba}	-2.38±0.3 ^{Ba}
2	70.17±0.4 ^{Ca}	70.78±0.4 ^{BCa}	-4.53±0.2 ^{Ba}	-4.43±0.1 ^{Ba}	-3.73±0.42 ^{Ca}	-3±0.4 ^{Ba}
3	69.61±0.3 ^{ACa}	69.86±0.7 ^{BCa}	-4.56±0.2 ^{Ba}	-4.49±0.4 ^{Ba}	-3.77±0.1 ^{Ca}	-3.54±0.9 ^{Ba}
4	68.91±0.9 ^{ACa}	68.63±1.6 ^{ACa}	-4.83±0.2 ^{Ca}	-4.52±0.6 ^{Ba}	-4.38±0.74 ^{Ca}	-3.93±1.7 ^{Ba}
5	68.46±0.8 ^{AC}		-4.85±0.3 ^C		-4.51±0.67 ^C	

N=6, excepto en *N=12

Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

sentido contrario para L (más luminosa) y b (tonalidades más azules) (Pereda *et al.*, 2007). Esta misma tendencia se observa en los resultados mostrados en la Tabla 4.11, aunque los valores iniciales de L y b difirien notablemente de los rangos hallados en la literatura (88-94 y 7-12, respectivamente). La luminosidad de leche cambio significativamente ($\alpha=0.05$) con el NP de HAP, más no con la P. La magnitud de L se incrementó con el primer pase de AP (indicativo de mayor blancura), para posteriormente, disminuir de forma gradual con pases sucesivos, hasta regresar a valores similares al valor inicial de leche cruda. De acuerdo a Pereda *et al.* (2007) una reducción en el valor de L generalmente indica una disminución en el tamaño micelar; asimismo, la leche homogeneizada, como se mencionó anteriormente, es más blanca pues el número incrementado de GG difracta la luz de forma más eficiente. Por tanto, se presume que el incremento inicial en el valor de L se debe a esta última razón; por su parte, la disminución en L al aplicar PM puede atribuirse a un leve efecto de las recirculaciones sobre el tamaño micelar. De manera análoga a L, los valores de a y b sólo variaron significativamente ($\alpha=0.05$) con NP, hasta cierto número de recirculaciones (2 pases para P=210 MPa, 1 pase para P=250 MPa); después, aunque

el valor medio se redujo con el NP, los cambios ya no fueron significativos. Cabe hacer notar que dichas diferencias instrumentales no eran perceptibles a simple vista, como se ha reportado con otros tratamientos a AP (Trujillo *et al.*, 2002).

La evolución en el tamaño promedio de partículas de leche al aumentar el NP de HAP se muestra en la Figura 4.4. El diámetro volumétrico de partícula en las muestras de leche se situó en el rango de 20 a 10,000 nm. Para leche cruda, se obtuvo una distribución bimodal, con el pico principal en el rango aproximado de diámetro promedio de 4800 a 5500 nm y con el segundo pico en el rango de 120 a 250 nm. Estos corresponden aproximadamente a los rangos de tamaño reportados respectivamente para glóbulo de grasa, cuyo diámetro promedio es de 3-5 μm y representan aproximadamente el 90% de la grasa presente en leche (Abeni *et al.*, 2005) y de micela de caseína, cuyo tamaño está en el rango de 50 a 500 nm, con un valor promedio de 180 a 220 nm (Thiebaud *et al.*, 2003).

Como se esperaba, en la Figura 4.4 se observan reducciones en el tamaño promedio y en la distribución de tamaños de GG en leche homogeneizada en comparación con los de leche cruda. Se pudo establecer que el diámetro del GG disminuyó con la aplicación de ambos tratamientos de HAP desde el primer pase, manteniendo la distribución bimodal, pero reduciendo el pico principal a un valor aproximado de 0.5 μm ; la magnitud de estos cambios es consistente con reportes previos empleando un homogeneizador similar (Zamora *et al.*, 2012a, Picart *et al.*, 2006). Para el tratamiento a 210 MPa no se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el tamaño de partícula al aplicar pases adicionales (ver Tabla 4.12); sin embargo, a 250 MPa aunque el diámetro promedio no varió al aplicar los primeros 2 pases, éste se incrementó significativamente en el tercer pase, debido a un aumento en el pico principal a un valor aproximado de 0.8 μm , para reducirse nuevamente con el cuarto pase. Este comportamiento puede atribuirse a una formación temporal de aglomerados de GG, como se ha reportado previamente (Olson *et al.*, 2004), los cuales se separaron al aplicar un pase adicional de AP. Es importante mencionar que, dado que el diámetro promedio de GG de leche homogeneizada está en el rango de tamaño

de las micelas de caseína, resulta complicado elucidar con certeza que participación tienen éstas últimas en la distribución de tamaño observada (Thiebaut et al., 2002)

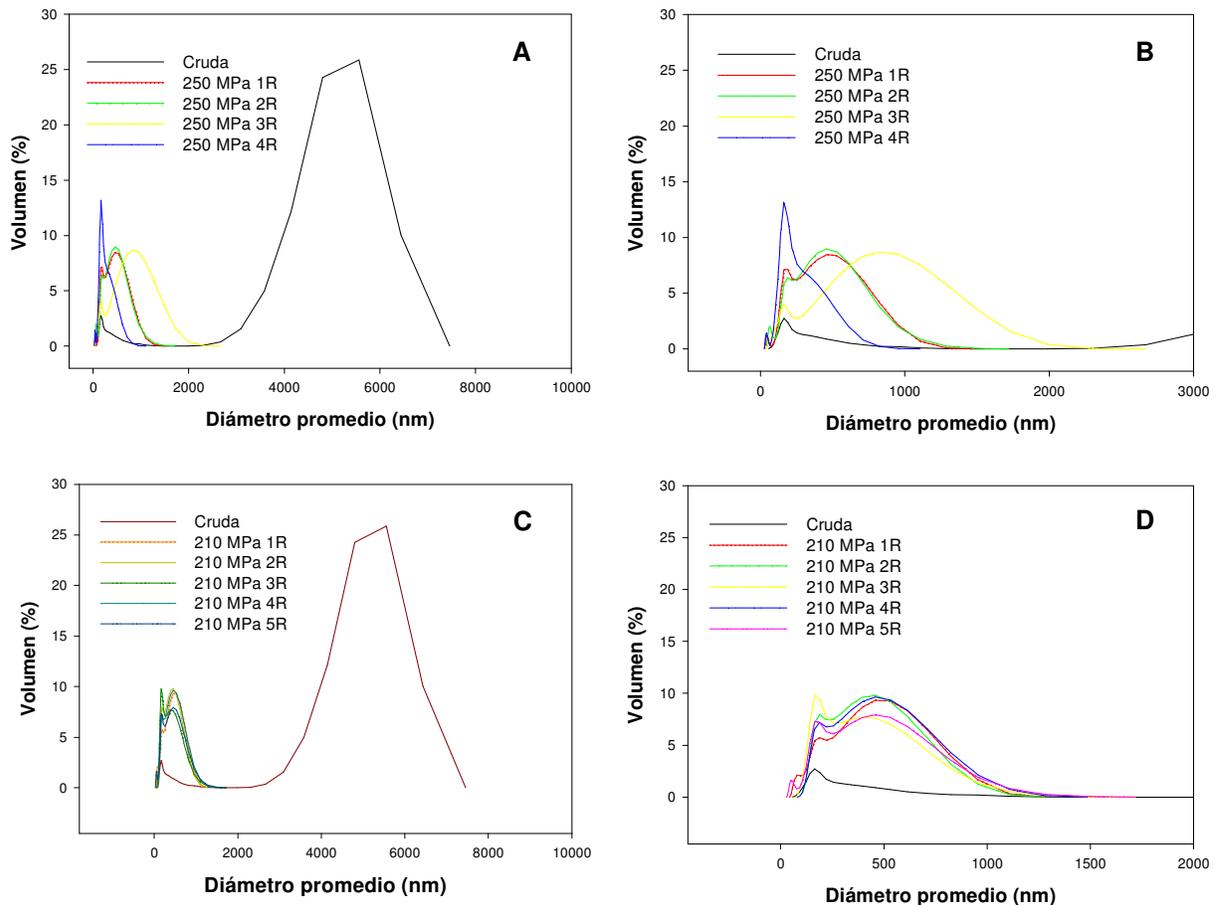


FIGURA 4.4 Cambio en tamaño de GG ($D_{4,3}$) de leche sometida a PM de HAP a 250 MPa y 210 MPa (**A,C**) Rango de 0-10 μ m (**B,D**) Rango de 0-2,3 μ m

En las Tablas 4.13 y 4.14 se muestran respectivamente los cambios en superficie específica para los diámetros volumétricos previamente mencionados y de carga proteica (γ) para los tratamientos HAP previamente definidos. Los valores de leche cruda para ambos parámetros se asemejan a los rangos reportados previamente en la literatura; el área superficial específica del GG usualmente está en el rango de 1.9 a 2.5 m²/g de grasa, aunque factores como la temperatura de la muestra, la época del año, el periodo de lactancia y la cantidad de grasa de la leche pueden afectarla (Huppertz y Kelly, 2006); en esta investigación el valor fue ligeramente menor (1.62

m²/g). Por su parte, γ en GG nativo se sitúa en un rango amplio, que va desde 1-2 mg proteína/m² de grasa (Ye *et al.*, 2002) hasta 9 mg/m² (Walstra *et al.*, 2006).

TABLA 4.12. Cambio en valores promedio* de tamaño de glóbulo graso en leche entera cruda tratada por PM de HAP

Pases	d _{4,3} (nm)	
	Presión (MPa)**	
	210	250
1	383.57 ± 16.08 ^{Aa}	382.13 ± 10.20 ^{Aa}
2	377.53 ± 16.55 ^{Aa}	386.27 ± 32.06 ^{Aa}
3	348.83 ± 20.62 ^{Aa}	646.75 ± 36.98 ^{Bb}
4	389.40 ± 38.82 ^{Aa}	239.63 ± 11.27 ^{Cb}
5	363.50 ± 37.80 ^A	
Leche cruda	4050.67 ± 45.96	

* N=3

**Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa; minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

La superficie específica cambió en forma inversamente proporcional a la disminución en el tamaño del GG. El aumento en el área es concomitante a la reducción en el diámetro promedio del GG (Tabla 4.12). Estos resultados se asemejan a los reportados por Zamora *et al.* (2012a), quienes para procesos de HAP a P=100-300 MPa y Ti=20, 30 y 40°C reportan superficies de GG en el rango de 20.96-47.61m²/mL_{grasa}, los cuales representan un incremento de 11.2 y 25.6 veces respectivamente en relación al área del glóbulo nativo y corresponden a la reducción de menor (91.1%) y mayor (96.1%) magnitud en el d_{4,3} de leche cruda. En este trabajo, el aumento de área superficial del GG tras los PM de HAP se situó en un rango de 6.2 a 17.9 veces el tamaño del GG nativo. Al igual que para los resultados de tamaño de partícula, el área específica no varió significativamente al aplicar PM de HAP a 210

MPa, y sólo cambió con el tercer y cuarto pases a 250 MPa, como se describió previamente; el mismo comportamiento se observó para γ (Tabla 4.14).

TABLA 4.13. Cambio en valores promedio* de superficie específica de grasa en leche entera cruda tratada por PM de HAP

Pases	Superficie específica (m ² /mL _{grasa})	
	Presión (MPa)**	
	210	250
1	17.10 ± 0.71 ^{Aa}	17.15 ± 0.45 ^{Aa}
2	17.37 ± 0.76 ^{Ab}	17.03 ± 1.38 ^{Ab}
3	18.82 ± 1.08 ^{Aa}	10.14 ± 0.41 ^{Bb}
4	16.94 ± 1.77 ^{Aa}	27.38 ± 1.32 ^{Cb}
5	18.14 ± 1.79 ^A	
Leche cruda	1.62 ± 0.02	

*N=3

**Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa; minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

TABLA 4.14. Cambio en valores promedio* de proteína total en membrana y carga proteica de glóbulo graso en leche entera cruda y a pases selectos de HAP

Leche	Proteína total en membrana** (g proteína/100g grasa)	Carga proteica** (mg proteína/m ²)
Cruda	0.52 ± 0.01 ^A	2.95 ± 0.05 ^A
210 MPa/ 5 Pases	1.31 ± 0.03 ^B	0.66 ± 0.07 ^B
250 MPa, 4 pases	1.84 ± 0.04 ^C	0.61 ± 0.03 ^B

*N=3

**Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

Resultados y discusión

Los resultados de γ obtenidos para leche HAP con 4 pases a 250 MPa y 5 pases a 210 MPa difieren de los observados por Cano-Ruiz y Richter (1997), pero son similares a los reportados por Zamora *et al* (2012a). En el primer caso, γ aumentó con la P (de 30 a 90 MPa) en procesos de homogeneización tradicional, como resultado de la disminución en el tamaño de partícula. Lee y Sherbon (2002) establecen que los GG en leche homogeneizada no pasteurizada adsorben preferencialmente micelas de CN enteras en la nueva superficie formada tras un proceso de homogeneización típica (<20 MPa), lo cual puede explicar el incremento de γ . Mientras tanto, Zamora *et al.* (2012a) realizaron tratamientos de un pase de HAP a 100-300 MPa, con Ti de 20-40°C, comparándolos con procesos HTST y homogeneización (15+3 MPa) /HTST. Los procesos HAP redujeron el valor de γ en el GG nativo (1.53 mg/m² en leche cruda) desde 59.5% (a 300 MPa, 20°C) hasta 93.5% (100 y 200 MPa, 20°C), mientras que la cantidad total de proteína ligada a GG en leche pasteurizada (HTST) y homogeneizada-pasteurizada aumentó su valor de forma no significativa (+0.12 g/100g grasa) y en una magnitud 11 veces superior (de 0.31 a 3.54 g/100 g de grasa) al valor de leche cruda, respectivamente; γ por su parte varió en +37% y -10%, para los mismos tratamientos. En esta investigación, la HAP redujo la carga proteica en 78 y 80% para PM de HAP a 210 MPa (5) y 250 MPa (4), respectivamente, sin existir diferencias significativas entre estos valores ($p < 0.05$). Sin embargo, debido a la mayor disminución en el tamaño de partícula en el tratamiento a PM de 250 MPa (Tabla 4.12), la cantidad efectiva de proteína ligada fue significativamente mayor que aquella para el tratamiento a PM de 210 MPa (1.83±0.02 vs 11.92±0.15 mg de proteína/mL grasa) lo cual indica la ocurrencia de diferentes tipos y magnitudes de interacciones proteicas en cada tratamiento. No se ha elucidado con claridad el tipo de estructuras que se forman y rompen en la membrana del GG con el proceso HAP. Se sabe que cuando la leche se trata térmicamente (sin homogeneización) la BLG se desnaturaliza y los GG se recubren de esta proteína sérica, lo cual se ha sugerido que se lleva a cabo por dos mecanismos diferentes: por formación de puentes disulfuro entre BLG desnaturalizada y proteínas nativas de membrana o por desplazamiento de estas últimas; además, la formación de puentes disulfuro entre KCN y BLG desnaturalizada

previamente e incorporada a la misma puede posibilitar la asociación de fragmentos o incluso micelas de CN enteras al material de membrana (Sharma y Dalgleish, 1993). Sin embargo, cuando se presentan procesos simultáneos de homogeneización y calentamiento (como ocurre con el caso de la HAP) las interacciones se vuelven más complejas y pueden incluir incorporación directa de fracciones de micelas de CN (Roach y Harte, 2008). La determinación de propiedades de tamaño y morfológicas de GG resultan de vital importancia dado que éstas influyen sobre la funcionalidad de la leche y sobre su capacidad para elaborar queso (García-Amézquita *et al.*, 2009). En la Figura 4.5 se muestran micrografías de leche cruda y de las leches tratadas por PM de HAP.

Las micrografías mostradas en la Figura 4.5 comprueban el potencial de HAP para reducir el tamaño y la distribución de tamaño de GG en leche bovina. El tamaño promedio del GG en leche cruda fue de $5.98 \pm 1.22 \mu\text{m}$ mientras que, para el nivel de magnificación empleado (100x), fue apenas visible en leches HAP por lo que no es posible reportar promedios ni mediciones de dispersión; sin embargo, los patrones de las observaciones realizadas en las pruebas de difracción láser son fácilmente identificables.

Como se mencionó anteriormente, se realizaron estudios exploratorios para determinar indicadores de desnaturalización y posibles interacciones entre las fracciones proteicas en tratamientos selectos de HAP de leche. Con tal fin, se implementaron tres protocolos que permitieran observar diferencias entre los controles y las muestras de leche HAP: análisis por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), NPAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). La espectroscopía de FTIR se ha empleado con frecuencia para estudiar cambios estructurales en proteínas lácteas, en particular aquellos asociados con la desnaturalización y la pérdida de estructura primaria y secundaria, explorando la relación de estas modificaciones con su funcionalidad (Dupont *et al.*, 2013) lo cual puede resultar de utilidad para observar el efecto de HAP sobre proteínas de leche y cómo modificaría esto la elaboración de queso.

Resultados y discusión

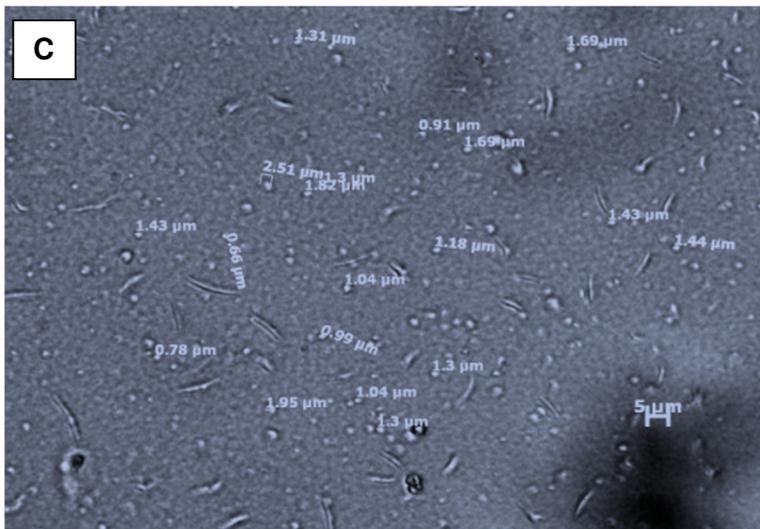
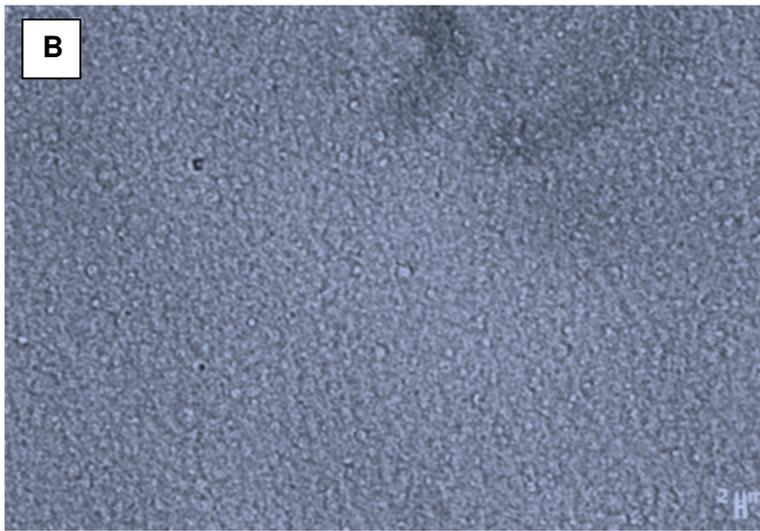
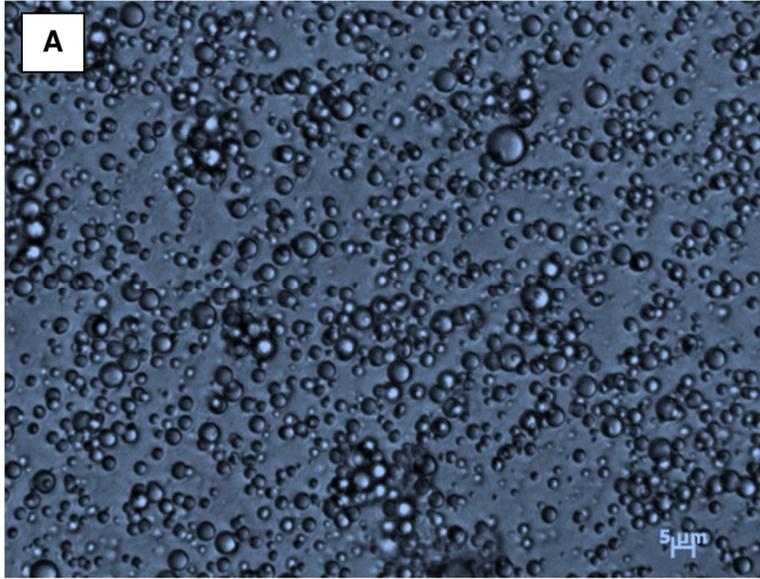


FIGURA 4.5 Micrografías de:
a) Leche entera cruda,
b) Leche HAP 210 5R y
c) Leche HAP 250, 4R

Resultados y discusión

Los resultados de los espectros de FTIR de leche tratada por PM de HAP muestran evidencia promisorio sobre la posibilidad de establecer un tratamiento alternativo de cuantificación de grado de desnaturalización proteica en leche, en particular de cambios asociados a la pérdida de estructura de BLG y su formación de complejos con KCN o consigo misma. En primera instancia, se obtuvieron espectros característicos de estándares de CNs y BLG (ALA no pudo ser analizada, al existir restricciones para su importación) dispersados en agua bidestilada a concentraciones dentro del rango reportado en leche bovina. Los espectros de ACN, BCN, KCN y BLG se muestran en la Figura 4.6; en ésta, es posible observar picos característicos en las bandas en el rango de $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ y $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ para todas las proteínas, correspondientes a las regiones de Amida I y Amida II, así como una región de absorción adicional ($1350-1200\text{ cm}^{-1}$) específica para BLG y correspondiente a la región de Amida III (Jang y Swaisgood, 2000). Con base en esta gráfica, se eligieron números de onda específicos para cada proteína para realizar un seguimiento de cada una de ellas al cambiar su concentración molar en un rango de 0 a $1000\text{ }\mu\text{M}$ con el fin de establecer zonas de variación lineal de la absorbancia vs concentración. Los números de onda para cada proteína láctea fueron los siguientes: BLG: $1216, 1367, 1590, 1740\text{ cm}^{-1}$; BCN: $1512, 1548, 1641\text{ cm}^{-1}$; ACN: $1548, 1642\text{ cm}^{-1}$; KCN: $1541, 1652\text{ cm}^{-1}$. Todos ellos mostraron un comportamiento aproximadamente lineal en el rango de concentración explorado (ver Anexo V). Se ha establecido que BLG es la proteína más susceptible a desnaturalizarse por efecto de la HAP; los cambios conformacionales de esta proteína sérica como consecuencia de procesos HAP han sido seguidos por FTIR previamente (Subirade *et al.*, 1998) donde se observó un máximo de absorbancia en la región de Amida I (1636 cm^{-1}) y se constató que niveles bajos de P ($<140\text{ MPa}$) no afectan la estructura secundaria de la proteína. Grácia-Juliá *et al.* (2008) no detectaron un efecto significativo de HAP sobre desnaturalización de BLG a $P < 225\text{ MPa}$. La desnaturalización de BLG puede provocar la formación de complejos con KCN o de agregados consigo misma, a través de la exposición de residuos desapareados de cisteína, que a su vez inicia una reacción en cadena de intercambio tiol-disulfuro (Considine *et al.*, 2008). Esto afecta la funcionalidad de la leche y, en particular, su

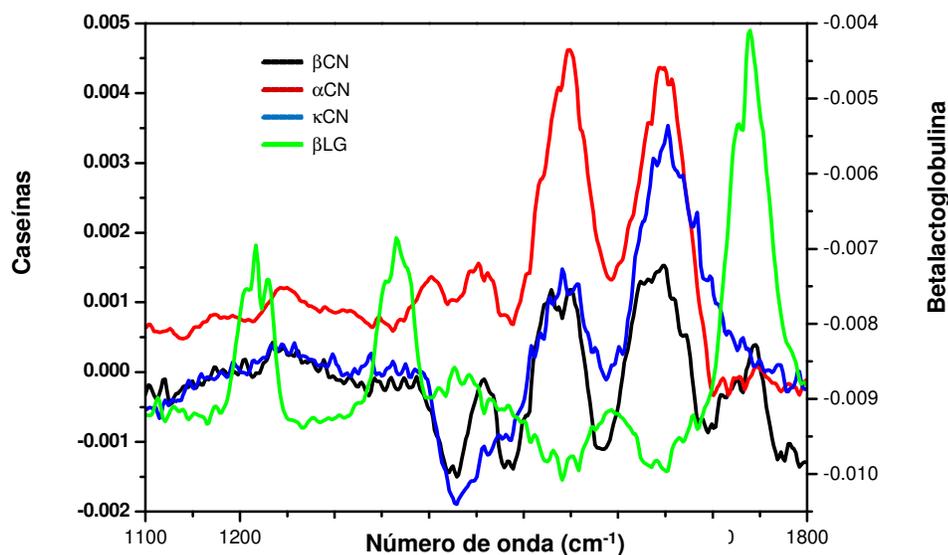


FIGURA 4.6 Espectros de infrarrojo en la región media de proteínas lácteas mayoritarias

correlación con cambios en tiempo de gelación, firmeza de gel y contenido de humedad final de la cuajada están bien documentados (Lamb *et al.*, 2013). Por ello, se hizo énfasis en el seguimiento de cambios asociados con la formación de complejos KCN-BLG o BLG-BLG como resultado de la aplicación de PM de HAP. En un estudio paralelo, Martínez-Valencia (2013) definió que los picos del espectro FTIR de leche bovina asociados cualitativamente a la aparición del polímero β LG- β LG se localizaban en los números de onda $1633\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$ y $1643\text{-}1646\text{ cm}^{-1}$, mientras que la presencia del complejo BLG-KCN podía ubicarse en los picos $1651\text{-}1652\text{ cm}^{-1}$ y $1710\text{-}1716\text{ cm}^{-1}$. Asimismo, en este mismo trabajo se concluye que distintos tratamientos de conservación propician la aparición preferencial de uno y otro tipo de agregado y diferentes intensidades de dichos procesos pueden verse reflejados en dos tipos de fenómenos espectrales: disminución de intensidades de absorbancia en las regiones de interés y/o corrimiento de picos hacia frecuencias más altas o más bajas.

En la Figura 4.7 (A y B) se presentan los comportamientos espectrales típicos obtenidos para leche tratada por PM de HAP a 210 y 250 MPa. En ambos casos, pueden observarse diferencias notables entre estos espectros y el de leche cruda. En

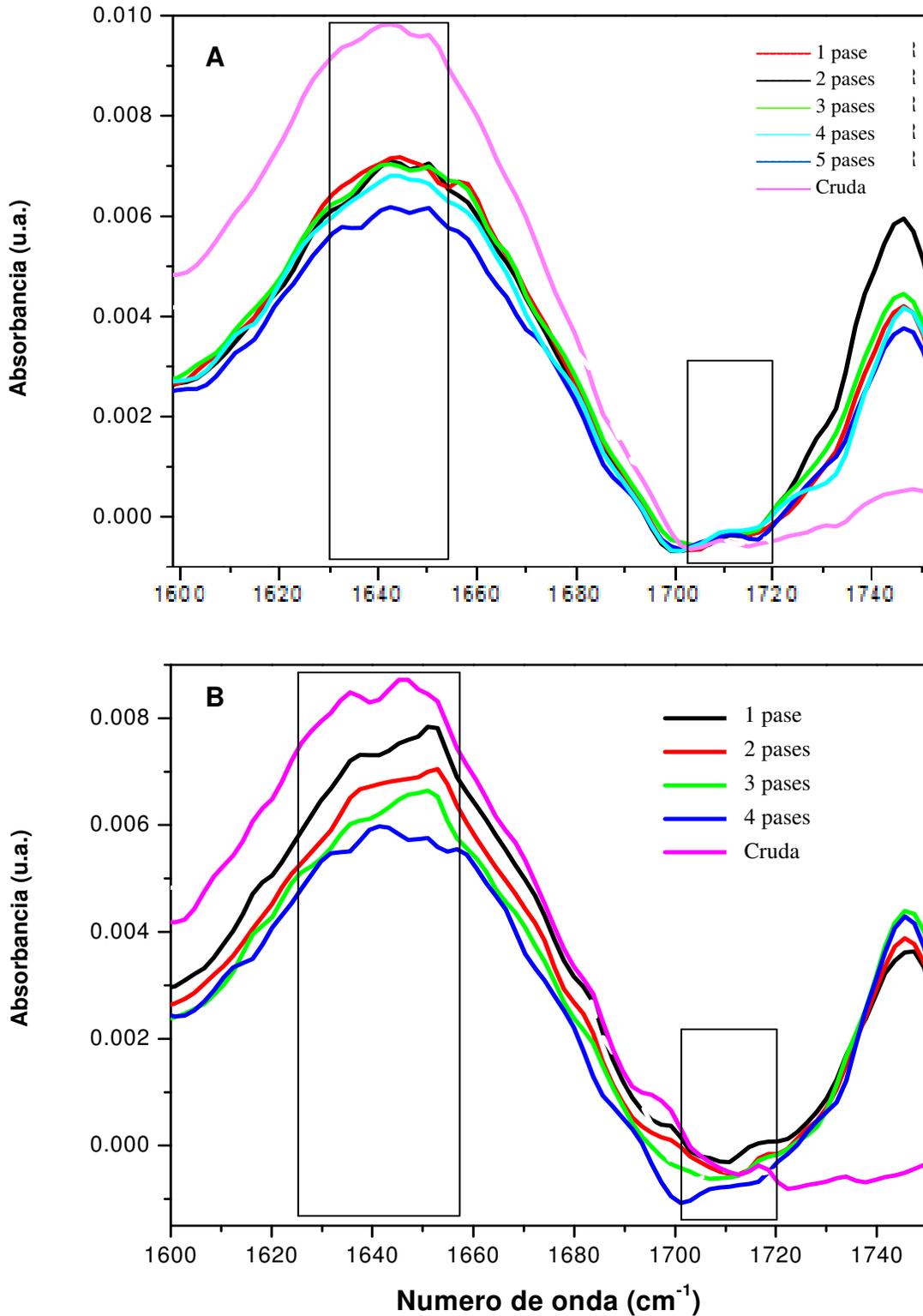


FIGURA 4.7. Comportamiento espectral de leche tratada con PM de HAP

A. A 210 MPa. **B.** A 250 MPa

Resultados y discusión

particular puede notarse un evidente decaimiento en las regiones asociadas con modificaciones estructurales de BLG, el cual se hace más pronunciado al incrementarse el NP de HAP. Para el proceso a 210 MPa, la disminución de la absorbancia ocurre desde el primer pase y posteriormente disminuye ligeramente con la aplicación de pases adicionales. Por otra parte, HAP a 250 MPa presentó una disminución progresiva en absorbancia al aumentar el NP, aunque la reducción final asociada a ambos procesos HAP fue similar. Subirade *et al.* (1998) reportan el mismo comportamiento espectral de BLG al aplicar HAP de un solo pase a P=130 y 140 MPa y asocian la banda dominante de absorción en la región de 1635-1645 cm^{-1} con la conformación β -laminar de BLG (la predominante), mientras que bandas más débiles en 1651 cm^{-1} y 1682 cm^{-1} consideran que corresponden a estructuras secundarias α -hélice y a la presencia de grupos C=O cercanos en conformación β -laminar antiparalelo, respectivamente. La reducción en absorbancia probablemente esté ligada a la inhibición de vibración de los enlaces asociados por efecto de la desnaturalización proteica, la cual tiende a incrementar las interacciones hidrofóbicas y la conformación de puentes de disulfuro entre las macromoléculas desplegadas. Al comparar cualitativamente los resultados de este trabajo y del antes mencionado, se observa que la magnitud del cambio espectral de los procesos HAP a un solo pase es similar, a pesar de las diferencias de P, lo cual indicaría que la estructura secundaria de BLG sólo se ve afectada levemente, aunque esto no permite evaluar la magnitud del posible cambio en la estructura terciaria. Mientras tanto, la reducción progresiva en absorbancia asociada a la aplicación de pases adicionales de AP puede ser indicativo del daño añadido sobre la estructura de BLG, que eventualmente pudiera desembocar en alteraciones en la estructura secundaria. Por otra parte, es importante recalcar que desde la aplicación del primer pase a ambos valores de P se puede detectar un corrimiento espectral evidente hacia las altas frecuencias, en especial a 250 MPa. De acuerdo a los resultados de Martínez-Valencia (2013) en tratamientos térmicos estos corrimientos se asocian con la prevalencia en la conformación del complejo BLG-KCN sobre la del polímero de BLG y pudiera utilizarse como indicador de adecuación de la leche para elaborar queso.

En la Figura 4.8 se muestran ejemplos de los electroferogramas obtenidos bajo condiciones no reductoras de leche cruda, pasteurizada y HAP a PM a 210 y 250 MPa. La movilidad electroforética de las proteínas lácteas en una PAGE nativa depende tanto de la carga proteica como de su tamaño y forma (Grácia-Juliá *et al.*, 2008); asimismo, su uso permite detectar la posible formación de agregados proteína previamente desnaturalizada y asociados a la aplicación de diferentes niveles de P y de pases múltiples de HAP. Los geles mencionados muestran la separación alcanzada por las proteínas y una posible pérdida de las mismas como consecuencia del PAP. De acuerdo a Anema (2012) y Pasztome-Huzsar (2008), las dos bandas con mayor distancia de migración corresponden a las dos variantes de BLG, denominadas A y B, enfatizando que la primera es más barorresistente a la desnaturalización que la segunda; mientras tanto, la tercera banda con mayor migración corresponde a ALA y el resto a caseínas y a proteínas de suero de mayor peso molecular (como albúmina bovina sérica). Como ha sido mencionado con anterioridad (Pereda *et al.*, 2009; Huppertz *et al.*, 2004c; Lopez-Fandiño *et al.*, 1996) ALA y CN son altamente resistentes a la desnaturalización térmica y barométrica, lo cual se puede comprobar en la figura previa, dado que las bandas indicadas apenas si se ven afectadas por los PM de HAP. Al igual que con las pruebas de FTIR, el análisis se centró entonces en la desnaturalización de BLG.

A partir de electroferogramas específicos se generaron densitogramas para determinar cuantitativamente el efecto de los tratamientos sobre la proporción inicial de BLG en leche cruda. A manera de ejemplo, en la Figura 4.9 se presentan densitogramas representativos de leche cruda, HTST, HAP a 4 pases de 250 MPa y HAP a 5 pases de 210 MPa. Tomando en cuenta los datos de las bandas correspondientes a BLG en densitogramas selectos se empleó la disminución en la intensidad de las mismas como una medida del grado de desnaturalización, de manera análoga a lo reportado por Anema (2012), donde el porcentaje de desnaturalización se calcula como un cociente entre las intensidades de banda del densitograma para leche presurizada vs. leche cruda.

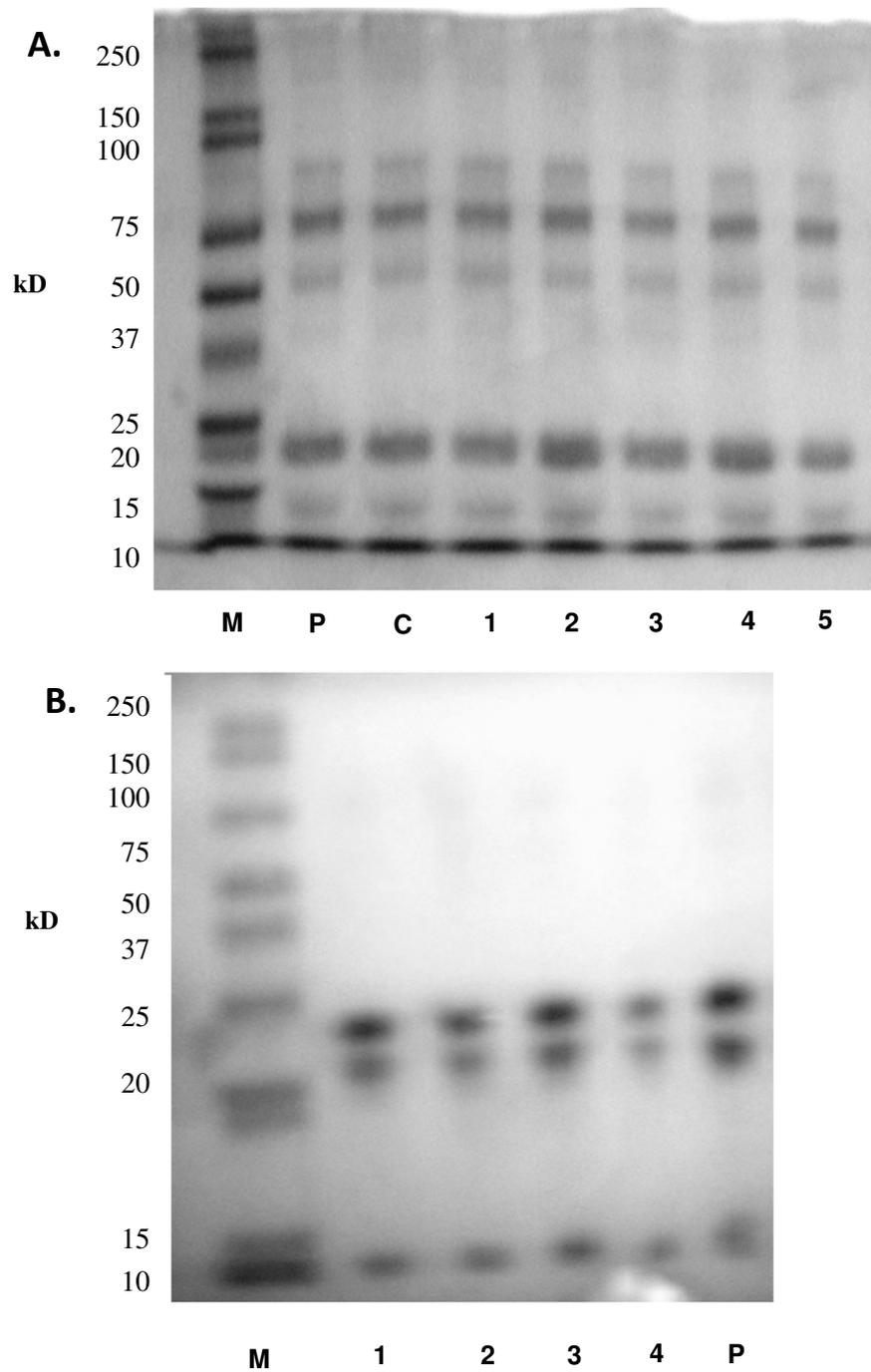


FIGURA 4.8 Separación de proteínas de leche sometida a PM de HAP por electroforesis nativa. **A.** 210 MPa. **B.** 250 MPa

(M) Marcador de peso molecular (P) Pasteurizada; (C) Cruda; (1-5) Número de pases de alta presión

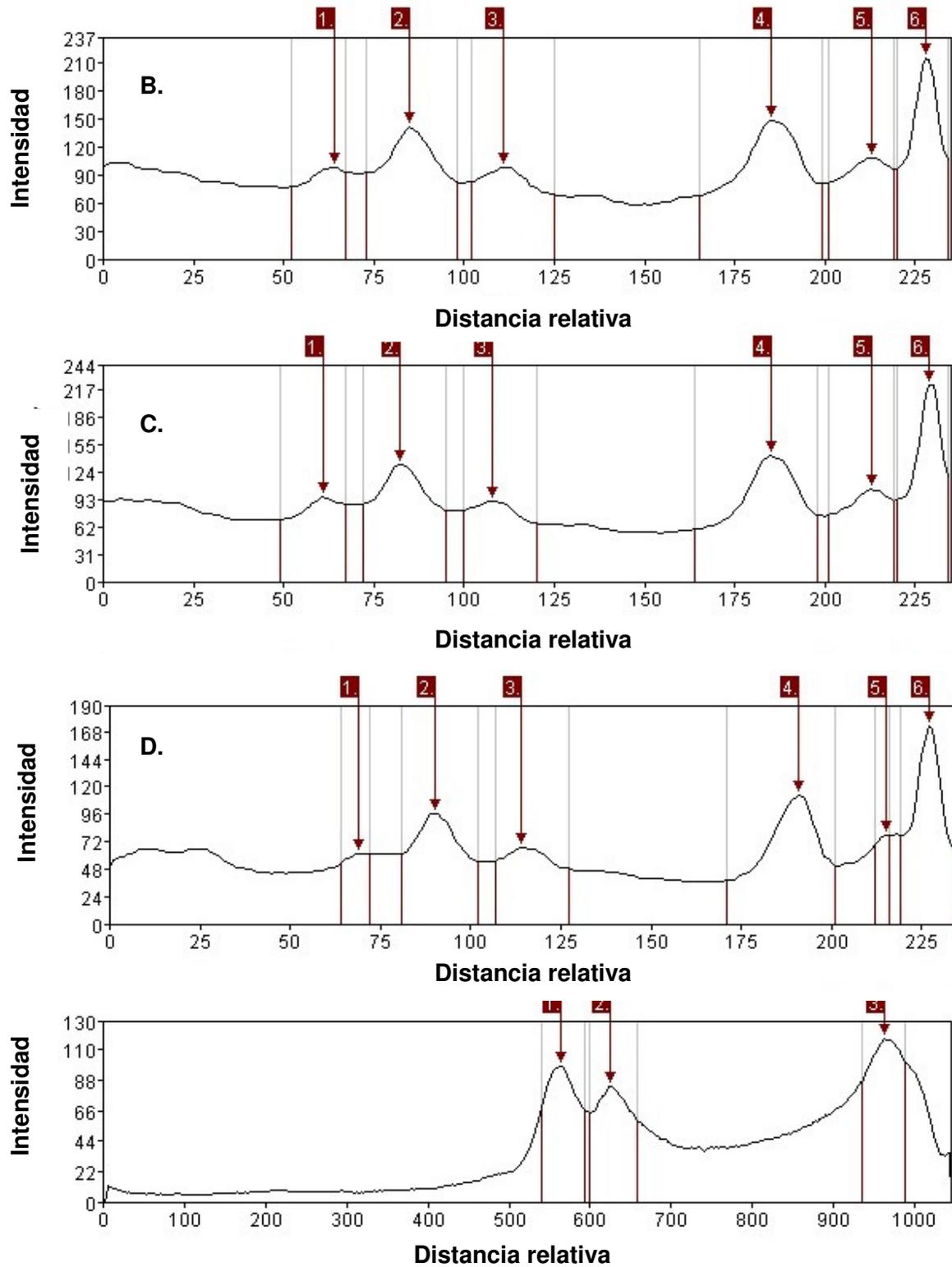


FIGURA 4.9. Densitogramas de proteínas lácteas en leche bovina
A. Cruda **B.** Pasteurizada **C.** HAP a 210 MPa **D.** HAP a 250 MPa

Resultados y discusión

Curvas representativas de desnaturalización de BLG por efecto de PM de HAP se muestran en la Figura 4.10; en ella puede observarse que el incremento en el número de pases de HAP ocasionó una desnaturalización acumulada de BLG; en todos los casos, a mayor P aplicada correspondió una proporción incrementada de BLG desnaturalizada. La aplicación de 5 pases de HAP a 210 MPa redundó en una disminución del 47% de BLG nativa, mientras que 4 pases a 250 MPa produjeron una disminución del 43.5%. Con un solo pase de HAP la desnaturalización de BLG fue de 7.8 y 10.5% para las HAP a 210 y 250 MPa, respectivamente. Estos resultados son de menor magnitud a los reportados por Pereda *et al.* (2009), quienes, empleando HAP a 200 MPa y 300 MPa con $T_i=30^\circ\text{C}$ lograron una disminución de 32 y 35% de BLG nativa (determinada por RP-HPLC), respectivamente, sin encontrar diferencias significativas entre ambos niveles de P. Como se mencionó anteriormente, el daño que puede causar HAP a proteínas séricas lácteas se encuentra íntimamente ligado al incremento de temperatura inherente al proceso (Hayes *et al.*, 2005). La diferencia entre estos resultados y los reportados en este trabajo pueden atribuirse a un mayor incremento de temperatura durante la presurización de leche (debido a una T_i superior, 30°C vs. 20°C) o bien al método de análisis empleado.

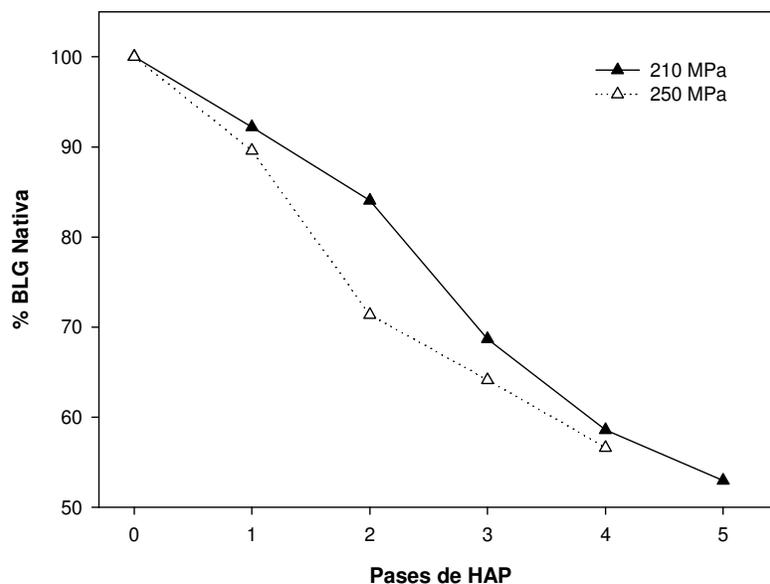


FIGURA 4.10. Desnaturalización de betalactoglobulina por PM de HAP

Finalmente, se obtuvo evidencia adicional de desnaturalización proteica en leche sometida a PM de HAP a partir de la caracterización de leche HAP por calorimetría diferencial de barrido (DSC). DSC se ha empleado como una técnica analítica valiosa para determinar cambios de fase o estado o transiciones transientes, incluyendo transición vítrea, cristalización, fundido y desnaturalización (Zhou y Labuza, 2011); en el caso de leche, se ha empleado sobre todo para establecer el nivel de desnaturalización térmica de proteínas séricas, principalmente BLG, ALA y albúmina bovina sérica, ABS (Anema, 2009). Un termograma de un tratamiento selecto a PM a 250 MPa, comparado con leche cruda y HTST se presenta en la Figura 4.11. El DSC detecta la desnaturalización proteica como un pico endotérmico y esto permite obtener información acerca de la proporción de proteína desnaturalizada presente en la muestra; generalmente, las proteínas presentan una menor temperatura de desnaturalización conforme es mayor la intensidad del tratamiento que se le aplica, debido a que cierta proporción de las mismas ya fue desnaturalizada (Mettler-Toledo, 2006). En pruebas de DSC con leche entera en polvo puede ubicarse un pico endotérmico en el rango de 70 a 80°C, el cual se relaciona con la desnaturalización de BLG (Zhou y Labuza, 2011). De acuerdo a Hussain *et al.* (2012), las temperaturas de desnaturalización de BLG puede ubicarse en los termogramas correspondientes en el punto de inflexión del pico endotérmico mencionado. Las temperaturas de desnaturalización para leches cruda, HTST y tratada por PM (1-4) de HAP obtenidas de la Figura 4.11 se muestran en la Tabla 4.15. Como era esperado, la temperatura de desnaturalización disminuyó al incrementarse la intensidad del proceso, aunque no había diferencia evidente entre los valores de temperatura para los procesos con 1-3 pases de HAP a 250 MPa y el de leche HTST, dado que todos se situaban en el rango de 73.8 a 74.6°C. La temperatura de desnaturalización de leche cruda (77.86°C) es similar a la reportada por Petit *et al.* (2011) para desnaturalización de BLG bajo condiciones de pH y fuerza iónica de leche (77°C); por su parte, 4 pases de HAP a 250 MPa redujeron notablemente la temperatura de desnaturalización (68.5°C). Esta evidencia sugiere que la aplicación de este último proceso, independientemente de la proporción de BLG desnaturalizada que propicia, es el que pudiera implicar un mayor cambio en las propiedades funcionales de la leche.

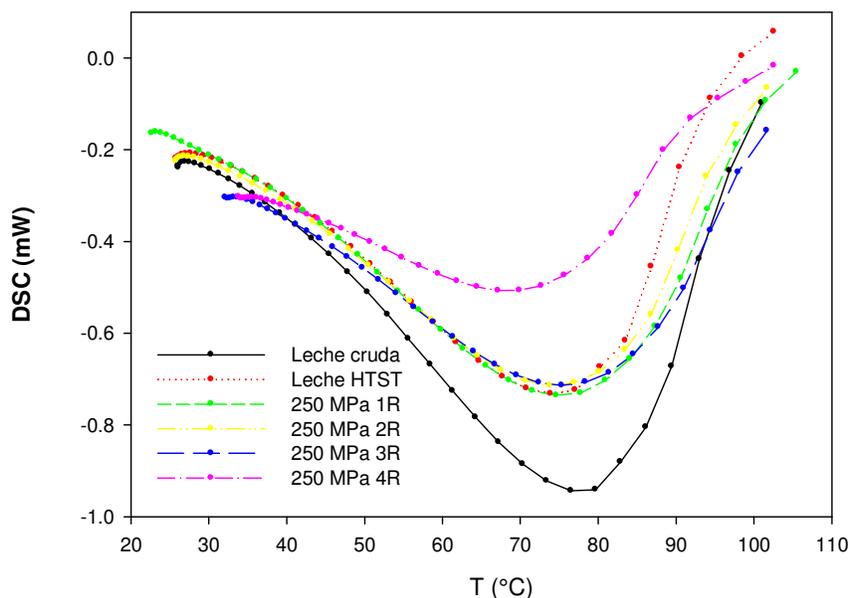


FIGURA 4.11. Termograma de leche entera sometida a PM de HAP a P selectas

TABLA 4.15. Temperatura de desnaturalización* de BLG calculada a partir de termogramas de leche bovina sometida a PM de HAP a 250 MPa

Leche	T _{desnaturalización} (°C)
Cruda	77.86
HTST	73.94
250 MPa, 1 pase	74.67
250 MPa, 2 pases	74.06
250 MPa, 3 pases	73.87
250 MPa, 4 pases	68.51

*Temperaturas obtenidas de un solo termograma

El enfoque multianalítico empleado para evaluar modificaciones proteicas en leche tratada resulta de utilidad para visualizar cambios estructurales acumulados provocados por PM de HAP. Sin embargo, es tarea pendiente implementar la metodología estándar (RP-HPLC) para validar los resultados obtenidos a través de las

técnicas analíticas empleadas así como elucidar el efecto de este tipo de procesos sobre la formación de complejos y agregados de BLG, los cuales, como se ha mencionado anteriormente, pueden incidir sobre las propiedades funcionales y tecnológicas de leche, afectando variables relevantes para la elaboración de queso como tiempo de coagulación, firmeza de cuajada, desarrollo de acidez, entre otras.

4.4 Elaboración de queso panela con leche pasteurizada térmicamente y por pases múltiples de HAP

Una vez establecida la factibilidad microbiológica y tecnológica del uso de leche “pasteurizada” por PM de HAP para la fabricación de quesos y de caracterizar cambios fisicoquímicos de esta leche que potencialmente pudieran afectar las características de coagulación de queso y las propiedades funcionales del queso, se elaboró queso panela con leche procesada por HAP a las condiciones optimizadas y con leche pasteurizada y se evaluaron factores tecnológicos (rendimiento, composición de queso y suero, sinéresis), características de calidad (colorimetría triestímulo, TPA) y parámetros fisicoquímicos (pH, microestructura) al día 1 y durante su almacenamiento refrigerado, cuando la naturaleza de la prueba lo permitía.

Los datos de rendimiento simple se muestran en la Tabla 4.16. Como puede observarse, la aplicación de PM de HAP en leche incrementó significativamente el rendimiento quesero en comparación del observado en quesos de leche HTST. El aumento en el rendimiento quesero se ha relacionado con el incremento de humedad de la cuajada y con cambios en las interacciones proteína-proteína y proteína-glóbulo graso causados por los efectos simultáneos de P y del incremento de T inherente al proceso (Zamora *et al.*, 2012b, 2007). La aplicación de HAP puede generar cambios en la naturaleza de las interacciones proteicas, inhibiendo la formación de puentes de hidrógeno en la cuajada e incrementando la inclusión de proteínas séricas a través de interacciones hidrofóbicas (Zamora *et al.*, 2012c). La mejor recuperación de proteínas séricas con alta CRA explicaría el mayor rendimiento de quesos elaborados con leche HAP en comparación con aquellos fabricados con leche HTST (Vannini *et al.*, 2008).

TABLA 4.16. Rendimiento de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o pasteurizada HTST

Tipo de leche	Rendimiento (%) ***
210 MPa, 5 Pases *	11.20 ± 1.39 ^A
250 MPa, 4 Pases *	11.77 ± 0.55 ^A
HTST **	9.46 ± 0.49 ^B

* N=4

** N=8

***Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

A rangos de $P < 300$ MPa, se ha reportado que el rendimiento quesero de leche HAP se incrementa con la P. Escobar *et al.* (2011) observaron un aumento en el rendimiento de queso fresco de 10.5% para quesos de leche pasteurizada HTST a 13% para quesos fabricados con leche HAP a un solo pase de 200 MPa. En esta investigación, los rendimientos obtenidos fueron menores (11.20% a 210 MPa, 5 pases; 11.77% a 250 MPa, 4 pases) y no se incrementaron con P. Por tanto, se consideró que, aunque el rendimiento quesero aumentó en aproximadamente 2%, el uso de PM, aunque necesario para alcanzar la inocuidad microbiológica buscada, impidió un mayor incremento de rendimiento. Evidencia previa apunta a que tratamientos más intensos de HAP, como $P > 250$ MPa o el uso de PM de homogeneización tienden a reducir el rendimiento quesero. Así, Escobar *et al.* (2011) reportan una disminución de rendimiento de aproximadamente 1% con un pretratamiento de leche a 300 MPa, en comparación con el proceso HAP a 200 MPa; el análisis composicional del suero de este queso mostró un aumento significativo de pérdida de proteína, lo cual explicaría la reducción en rendimiento. La disminución en la cantidad de proteína retenida en el queso puede estar asociada con una disociación parcial de micelas de CN y una subsecuente migración de fracciones micelares, particularmente κ CN y α_{s1} CN, a la fase sérica, lo cual ha sido reportado en trabajos previos a condiciones selectas de HAP (Roach y Harte, 2008). La magnitud de incremento de rendimiento no fue tan alta como la observada en otros trabajos probablemente debido a esto último. Los cambios

composicionales del queso panela producto de los pretratamientos de PM de HAP y asociados con los cambios en rendimiento antes mencionados se presentan en la Tabla 4.17. Al compararse con el tratamiento estándar, los procesos HAP provocaron un aumento significativo del contenido de humedad, aunque no se observaron diferencias entre ambos tratamientos a alta presión. Esto resulta consistente con resultados previos de humedad de quesos frescos elaborados con leche tratada por HAP. Por ejemplo, Zamora *et al.*, (2011) obtuvieron un queso con mayor humedad (68.61 g/100g) al tratar leche a 300 MPa, 30°C que la obtenida con pasteurización térmica (67.39 g/100g). Efectos similares se han reportado con PM de HAP. Kheadr *et al* (2002) lograron aumentar la humedad de queso Cheddar de 37.24 a 39.96 g/100g queso tratando leche con 5 pases de HAP a 200 MPa en comparación con leche HTST. El aumento en la humedad del queso, como se planteó anteriormente, se ha relacionado con una mayor incorporación de proteína sérica desnaturalizada, tanto formando complejos con CNs, como contribuyendo en mayor medida a la conformación de la nueva membrana de GG. Zamora *et al.* (2011) identificaron por análisis termogravimétrico una tipología de agua diferente en quesos HAP comparada con la presente en quesos de leche HTST o HTST-homogeneizada. El tratamiento HAP genera un incremento en la cantidad de agua ligada y una reducción en la proporción de agua libre, lo cual se relaciona con una mayor cantidad de proteína en la cuajada, primordialmente BLG. La capacidad de hidratación de BLG se encuentra en función de su grado de desnaturalización (que al incrementarse se ve favorecida) y de su capacidad de interacción o agregación con otras proteínas (que, por el contrario, la disminuye). Aunque en el presente proyecto no se realizaron pruebas para determinar la concentración de proteínas séricas no desnaturalizadas se asume que posibles modificaciones en el grado de interacción proteína-proteína imposibilitaron una mayor capacidad de hidratación proteica y, en consecuencia, el rendimiento no fue tan alto como era esperado, en función de lo reportado en la bibliografía. Cabe destacar que el contenido de humedad de los quesos elaborados con leche HAP, aunque incrementado, cumple con las especificaciones fisicoquímicas indicadas en la Norma Mexicana correspondiente (NMX-F742, 2012), donde se establece que éste debe ser <58% p/p.

Resultados y discusión

Los contenidos de proteína en base húmeda y seca de quesos HAP y HTST se presentan en la Tabla 4.17. La HAP provocó un incremento significativo en la composición proteica del queso panela; como se comentó con anterioridad, esto se debió a la asociación de micelas de caseína con BLG. Zobrist *et al* (2005) confirmaron esta aseveración al observar que no existían cambios en las propiedades de elaboración de queso cuando la leche sometida a AP estaba libre de proteínas de suero o pretratada con un agente químico (KIO_3) que prevenía la interacción KCN-BLG desnaturalizada mediante la oxidación de grupos sulfhidrilo.

TABLA 4.17. Composición de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. pasteurizados***

Tipo de leche	Humedad (%) [*]	Proteína (%) ^{**}	Proteína en base seca (%)	Grasa (%) ^{**}
210 MPa, 5 Pases	53.37 ± 1.20 ^A	19.06 ± 0.45 ^{AB}	40.87 ± 0.25 ^A	18.75 ± 0.70 ^A
250 MPa, 4 Pases	53.56 ± 1.60 ^A	20.26 ± 0.16 ^A	43.63 ± 0.33 ^B	19.00 ± 0.71 ^A
HTST	49.48 ± 1.51 ^B	18.46 ± 0.52 ^B	37.30 ± 1.06 ^C	20.13 ± 0.88 ^A

* N=4

** N=8

***Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

El contenido proteico (en base húmeda) de todos los quesos, tanto de los HAP como del HTST, se encuentra dentro del rango de valores permitido por la Norma Mexicana correspondiente (NMX- F742, 2012), que especifica un contenido mínimo de proteínas lácteas del 18%. No se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de proteína en base húmeda entre ambos tipos de queso HAP; sin embargo, ésta si fue observada al calcular el contenido de proteína en base seca. Zamora *et al.* (2012c) reportan un incremento de proteína en base seca en cuajada de queso fabricada con leche bovina (3.6% de grasa) de 29.59 g/100g de queso en leche cruda a 32.61 g/100g con leche sometida a HAP (300 MPa, 30°C); este aumento fue mayor que el obtenido con leche HTST/homogeneizada (31.83%). La proteína en base seca

para los dos quesos HAP elaborados en este proyecto fue de mayor magnitud (43.63% y 40.87% para los quesos panela elaborados con leche a 250 MPa, 4 pases y 210 MPa, 5 pases, respectivamente) lo cual puede interpretarse como resultado del efecto aditivo de los PM de HAP sobre la desnaturalización de proteínas séricas barosensibles, particularmente BLG. Reportes previos indican que el uso de PM influye sobre el grado de agregación de proteínas séricas (Paquin *et al.*, 1999) y que la desnaturalización ocurre sólo a P>200 MPa, aunque no hay información sobre la proporción de proteína nativa remanente en leche al combinar P y PM de HAP. La mayor recuperación de proteína observada en quesos HAP fue consistente con los resultados del análisis del suero expelido durante el almacenamiento refrigerado de quesos panela, como se observa en la Tabla 4.18.

TABLA 4.18. Composición de suero de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o pasteurizada HTST***

Tipo de leche	Proteína (%)	Grasa (%)	Cenizas (%)	Lactosa (%)
210 MPa, 5 Pases *	0.85 ± 0.03 ^A	1.23 ± 0.10 ^A	0.67 ± 0.02 ^A	4.11 ± 0.07 ^A
250 MPa, 4 Pases *	0.80 ± 0.04 ^A	1.16 ± 0.11 ^A	0.60 ± 0.05 ^A	3.92 ± 0.04 ^A
HTST **	1.12 ± 0.12 ^B	0.06 ± 0.09 ^B	0.69 ± 0.07 ^A	3.97 ± 0.11 ^A

* N=4

** N=8

***Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

Ambos tratamientos de HAP produjeron un decremento significativo en el contenido de proteína del suero en comparación con los quesos de leche pasteurizada (0.80-0.85% vs. 1.12%), aunque no se observaron diferencias entre los tratamientos a alta presión. Estos resultados se asemejan a los reportados por Zamora *et al.* (2007), en los cuales todos los tratamientos de HAP> 200 MPa mostraron una reducción significativa en la cantidad neta de N en suero, dentro de la cual, la mayor disminución correspondió a BLG (91% de la proteína recuperada). Aunque en el presente trabajo no se verificó la identidad de las proteínas presentes en el suero, se presume que,

considerando el incremento de rendimiento menor al esperado, debió estar conformado por ALA (altamente resistente a la desnaturalización térmica y barométrica) y fracciones de CN desprendidas de la micela debido a la intensidad del proceso.

En la Tabla 4.17 se muestra también el porcentaje de grasa en queso y en la Tabla 4.18 el contenido de grasa en el suero expelido durante la elaboración. Todos los quesos elaborados cumplen con el contenido mínimo de grasa permisible en la legislación mexicana (NMX- F742, 2012), el cual debe ser mayor al 19%. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de grasa en base húmeda en los quesos elaborados con leche HAP o HTST; sin embargo, el valor promedio fue menor para ambos tipos de queso HAP, lo cual refleja una menor capacidad de la red proteica para poder retener la grasa. Esta tendencia se repitió para el contenido de grasa en base seca (datos no mostrados) y se confirmó con los datos de composición de suero de queso panela, dado que se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la recuperación de grasa butírica entre los quesos de leche HTST (0.06%) y los de leche HAP (en el rango de 1.16-1.23%). Usualmente la homogeneización propicia una mejor retención de grasa en cuajada dado que la reducción en el tamaño de partícula implica un cambio en la constitución de la membrana del GG, la cual se conforma con fracciones de micela de CN o inclusive de micelas enteras, dependiendo de la P aplicada y esto se ve reflejado en un incremento en el rendimiento neto (Zamora *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos no concuerdan con esta aseveración y, además, tuvieron influencia en el rendimiento obtenido. Una de las principales causas de la pérdida de grasa durante la fabricación de queso es el corte de cuajada cuando la firmeza de ésta es inadecuada. Una incorporación considerable de proteínas de suero imposibilita la conformación de una red tridimensional de caseínas con el grado de firmeza apropiado y conduce a pérdidas de humedad y de grasa durante el corte y el manejo posterior de los fragmentos de cuajada. Zamora *et al.* (2007) mostraron que, aunque los tratamientos HAP de un solo pase disminuyen el tiempo de coagulación de manera importante, la firmeza de cuajada a los 30 min disminuía en 15-20% al aplicar tratamientos HAP en dos etapas

y a $P > 200$ MPa, como los empleados en este trabajo. La mayor pérdida de grasa en el suero se puede relacionar con esta aseveración.

Otro factor tecnológico evaluado en esta etapa fue la sinéresis, uno de los defectos típicamente encontrados en queso panela y otras variedades de queso fresco, debido a su alto contenido de humedad (Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009); los resultados de sinéresis durante el almacenamiento refrigerado (21 d) de queso panela elaborado con leche HAP o HTST se muestran en la Tabla 4.19. Mientras que el proceso de leche a 210 MPa con 5 pases no varió significativamente la cantidad de suero perdida durante el almacenamiento en comparación con el tratamiento de pasteurización térmica, el tratamiento a mayor P (250 MPa, 4 pases) produjo un incremento significativo ($p < 0.05$) en el suero expelido. Sin embargo, cuando los resultados se expresaron como pérdida de peso por sinéresis ($>30\%$ de pérdida para el tratamiento a 250 MPa; $>25\%$ a 210 MPa), era evidente que ambos tratamientos HAP eran menos aptos que el HTST (aprox. 13% de pérdida) para retener la humedad durante el almacenamiento. Aunque el incremento de rendimiento quesero producto de la HAP se atribuye principalmente al mejoramiento en la capacidad de retención de agua de las proteínas en el queso, como se planteó anteriormente, la estructura de la red proteica resultante tras los procesos HAP resultó menos adecuada para retener la humedad durante el almacenamiento. Estos resultados son opuestos a los presentados por Zamora *et al.* (2011) quienes estimaron la sinéresis teórica máxima de quesos frescos preparados con leche HAP (300 MPa, $T=30^{\circ}\text{C}$) mediante una prueba de centrifugado, comparando los valores obtenidos con los de procesos HTST y HTST+ homogeneización convencional. Ambos tratamientos de homogeneización redujeron significativamente la sinéresis máxima teórica del queso fresco. A los 13 días de almacenamiento, los quesos HTST exhibían una pérdida de peso de aproximadamente 24%, mientras que los HAP apenas habían perdido el 15%; tras 19 días, estos últimos habían perdido cerca del 19% de su peso original; en comparación, ambos procesos a PM implementados en este proyecto generaron una pérdida de peso sensiblemente mayor. La sinéresis en geles lácteos se relaciona con la contracción y subsecuente reordenamiento.

TABLA 4.19 Sinéresis y pérdida de peso tras 21 días de almacenamiento refrigerado (4°C) de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. HTST

Tipo de leche	Sinéresis (g)*	Pérdida de peso (%)*
210 MPa, 5 Pases **	70.10 ± 2.58 ^A	25.44 ± 2.68 ^A
250 MPa, 4 Pases **	101.19 ± 3.96 ^A	30.47 ± 0.62 ^B
HTST **	71.34 ± 2.66 ^B	13.26 ± 0.55 ^C

* N=3

**Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

de la matriz proteica durante el almacenamiento y afecta características sensoriales del producto, como apariencia y textura. Una vez que el gel se forma producto del cuajado enzimático de la leche, la caseína mantiene muchos sitios activos susceptibles de reaccionar entre si; al formarse nuevos enlaces, produce una compactación del queso. La sinéresis resultante se ha intentado reducir mediante la aplicación de soluciones tecnológicas como el uso de cultivos productores de exopolisacáridos ligantes de agua (Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009) o la aplicación de alta presión a la cuajada (Okpala *et al.*, 2010). Escobar *et al.* (2011) reportan una mejor retención de agua en quesos frescos elaborados con leche HAP previamente pasteurizada, argumentando que la combinación de dichos tratamientos promovía la conformación de una matriz delgada de CNs y PS que permitía retener mejor la humedad del queso. En los tratamientos implementados en este proyecto se presume que la HAP cambió las interrelaciones entre proteínas, haciendo más densa la estructura del queso, reduciendo su CRA, especialmente con los tratamientos a mayor P. Estos resultados se compararon positivamente con la estructura del queso determinada por microscopía electrónica, lo cual se discute más adelante.

La sinéresis del queso fresco se ha demostrado también que está potenciada por diversos cambios bioquímicos que se traducen en una reducción del pH durante su almacenamiento refrigerado. El cambio en pH de quesos pasteurizados por PM de HAP o por tratamiento térmico convencional se muestra en la Figura 4.12. Aunque al

día 1 los quesos HAP presentaron valores de pH mayores (<6.67) que el promedio para quesos HTST (6.52) su evolución durante el almacenamiento fue marcadamente diferente. A los 7 días, el pH no presentó una diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos (los cuales estuvieron en el rango de 6.61-6.67); posteriormente, el pH de los productos elaborados con los tratamientos a 250 MPa y HTST disminuyeron con el tiempo de almacenamiento pero se mantuvieron sin diferencia significativa ($p < 0.05$); la excepción fue el pH del queso HAP a 210 MPa, el cual disminuyó significativamente a partir de los 14 d de almacenamiento (6.16) y se mantuvo en ese rango a los 21 días de almacenamiento, mientras que el pH de los quesos de los otros tratamientos se situaban en el rango de 6.3-6.4. Zamora *et al.* (2012) no observaron cambios importantes en el pH de quesos frescos HAP (1 pase a 300 MPa) y HTST, los cuales estuvieron en un rango de 6.70 a 6.75 durante 13 días de almacenamiento refrigerado, aunque el valor para quesos HAP siempre fue mayor. De manera similar, Guerzoni *et al.* (1999) no observaron un cambio significativo en el pH de queso de cabra elaborados con leche HAP o HTST tras 15 d de maduración, mientras que Voigt *et al.* (2012) reportan una disminución significativa (aprox. -0.2 unidades) en el pH de queso Cheddar sometido a tratamientos selectos de AP durante los primeros 60 d de maduración (cuando la proteólisis del queso aún era limitada). Por otra parte, Guerra-Martínez *et al.* (2012), al analizar posibles modificaciones fisicoquímicas durante el almacenamiento refrigerado (2,5°C) de queso Panela (elaborado con leche entera pasteurizada con adición de cultivos mesófilos) reportaron un cambio en el pH del queso de 6.45 al día 1 a 6.03 al día 15. La reducción en la magnitud del pH del control y los quesos HAP elaborados en esta etapa es semejante a este último trabajo; sin embargo, el queso HAP a 210MPa presentó una disminución considerablemente mayor (-0.7 unidades) por lo que es posible que este tipo de proceso produzca un queso con condiciones más propicias (p.e. aw) para el crecimiento de alguna bacteria acidoláctica que sobreviviera al proceso y que produjera ácidos orgánicos responsables de esta condición.

La apariencia de los quesos HAP y control tras 1 días de almacenamiento se muestra en la Figura 4.13. Es posible observar diferencias importantes en la estructura de los quesos, en particular con el grado de unión de las partículas de cuajada y su

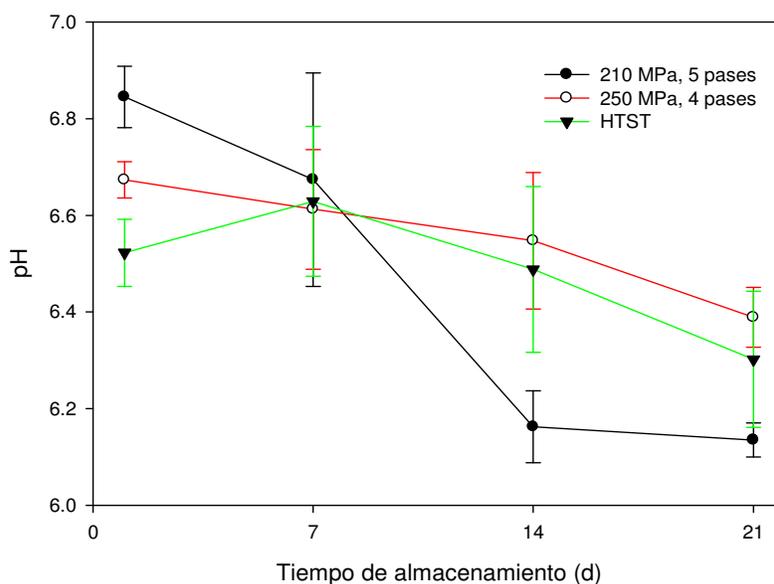


FIGURA 4.12. Cambio en pH durante el almacenamiento refrigerado de quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP (n=3) o HTST (n=6)

tendencia a desarrollar grietas o aberturas; además, también difiere su color. Los quesos Panela HTST (4.13 A) presentaron la apariencia de un producto de este tipo, elaborado a pequeña escala: húmeda, brillante, con cuerpo parcialmente abierto, donde a pesar de estar adecuadamente fusionados aún eran distinguibles los gránulos de cuajada. Mientras tanto, los quesos elaborados con leche HAP mostraron diversos defectos texturales; los elaborados con leche tratada a PM de 210 MPA (4.13 B) poseían grietas pronunciadas, mientras que los fabricados con leche HAP con PM a 250 MPa eran opacos, de textura sumamente compacta y con presencia de aberturas superficiales (4.13 C); ambos, además, eran más quebradizos que el control. La mayoría de estas características han sido previamente descritas como defectos relacionados con quesos de humedad elevada y/o fabricados empleando leche homogeneizada y su magnitud depende de P y del incremento de temperatura (Guinee, 2007).

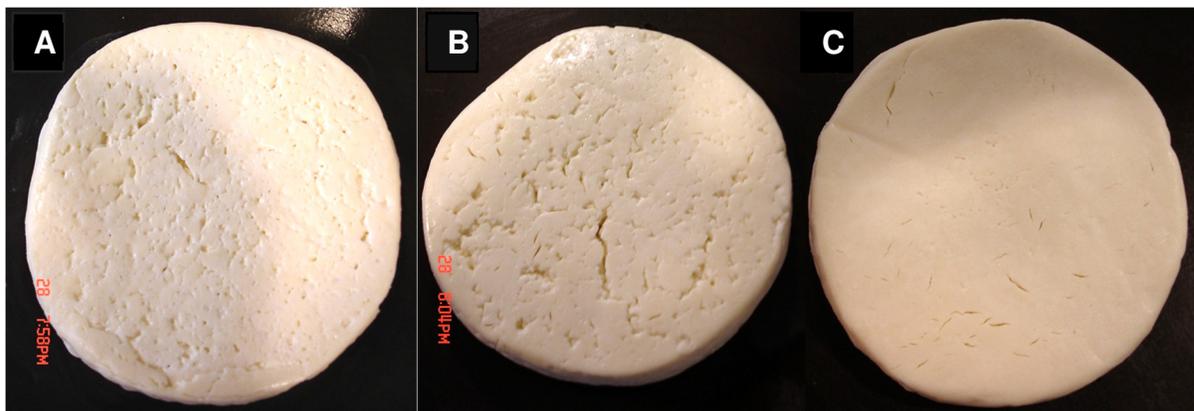


FIGURA 4.13. Quesos Panela elaborados con leche tratada por diferentes métodos de conservación. **A.** HTST **B.** 5 PM de HAP a 210 MPa **C.** 4 PM de HAP a 250 MPa

Zamora *et al.*, (2011) hallaron problemas producto del tratamiento de leche para quesería por HAP (300 MPa, un pase) pues el queso fresco fabricado se desmoronaba con facilidad (baja cohesividad) y ocasionaba problemas durante el corte y el manejo posterior de la cuajada. Escobar *et al.* (2011) obtuvieron quesos frescos con problemas texturales similares, los cuales se solucionaron en gran medida aplicando un tratamiento mixto (300 MPa+HTST), el cual también solucionó la sinéresis intensa asociada con este tipo de proceso. Para comprobar esta observación, se elaboró un queso panela con leche HAP con un pase de 210 MPa, seguido de pasteurización HTST. El queso resultante (Figura 4.14) presentó mayor rendimiento (17.1%), con sinéresis <0.3%, sin defectos texturales aparentes. De acuerdo a lo anterior, la aplicación de PM de HAP como tratamiento de leche para elaboración de queso panela resulta promisorio, pero se requiere investigar alternativas de modificación de parámetros selectos del proceso para maximizar sus beneficios.

Con la finalidad de ahondar sobre las características microestructurales de quesos HAP comparados con aquellas del control y cómo éstas influenciaron propiedades selectas del producto (textura y color instrumental) se obtuvieron



FIGURA 4.14. Queso Panela elaborado con leche HAP a 210 MPa y HTST

micrografías SEM (3000X) de muestras de quesos tras 7 y 21 días de almacenamiento, las cuales se muestran en la Figura 4.15. El arreglo estructural del queso HTST (4.13 A) es muy semejante al reportado en investigaciones previas (Lobato-Calleros *et al.*, 2006; Hernández-Tinoco *et al.*, 2004), con una red tridimensional conformada por clusters de micelas de CN, interrumpida por numerosas cavidades semihesféricas y tamaño heterogéneo, originalmente ocupadas por glóbulos de grasa. Se sabe que los tratamientos a AP en leche propician la conformación de una estructura mucho más cerrada en el queso debido a una reducción en el tamaño promedio de la micela de caseína propiciando con ello el aumento de las interacciones CN-CN y CN-GG (Pereira *et al.*, 2009), aunado al hecho que el HAP reduce sensiblemente el tamaño del GG (Picart *et al.*, 2006). Precisamente una estructura más cerrada se observa en las micrografías de los quesos elaborados con leche tratada a PM de 210 MPa (4.13 B) y 250 MPa (4.13 C) de manera semejante a las diferencias visuales en microestructura de quesos de leche HTST, HTST + homogeneizada y HAP (300 MPa, 20°C) observada por Zamora *et al.* (2011) empleando microscopía confocal. La estructura del queso pasa de una altamente porosa a una matriz proteica continua y densa, con cavidades más pequeñas, que reflejan una mayor interacción proteica, posible presencia de proteínas séricas aglomeradas en torno a las micelas y hacen suponer que los GG estaban embebidos en la estructura del queso, como fue sugerido por Kheadr *et al.* (2002) al observar las micrografías de transmisión para queso Cheddar (en etapas tempranas de maduración) elaborado con leche tratada por PM de HAP a 200 MPa.

Resultados y discusión

Una matriz proteica densa en queso generalmente se relaciona con incrementos en la firmeza y cohesividad y una disminución en la capacidad de deformación atribuible a la ausencia de GG que interrumpan la continuidad de la matriz; asimismo, puede intensificar la sinéresis, como se mencionó con anterioridad. Las diferencias entre las micrografías de los quesos control y HAP junto con los cambios composicionales antes reportados son útiles para explicar las modificaciones en características funcionales y sensoriales descritas a continuación y en la siguiente sección, respectivamente.

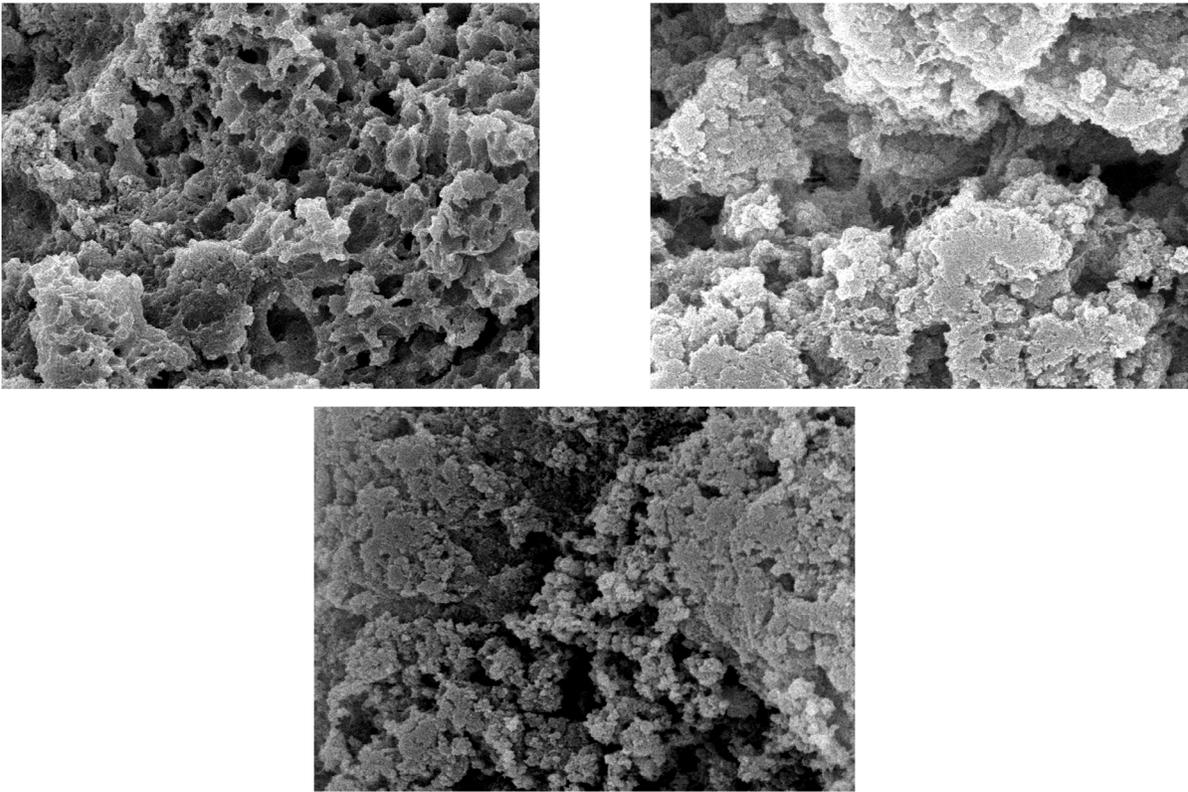


FIGURA 4.15. Micrografías SEM de quesos Panela elaborados con leche tratada por diferentes métodos de conservación. **A.** HTST **B.** 5 PM de HAP a 210 MPa **C.** 4 PM de HAP a 250 MPa

La evolución durante el almacenamiento de parámetros texturales de quesos elaborados con leche tratada por PM de HAP y por HTST se presentan en las Tablas

4.20-4.22. Los cambios en firmeza se observan en la Tabla 4.20; el análisis estadístico correspondiente muestra efectos significativos del tipo de queso, del tiempo de almacenamiento y de la interacción. No se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en dureza de quesos al día 1 de almacenamiento refrigerado; posteriormente, ésta se incrementó a los 7 días de almacenamiento en todos los casos, para posteriormente disminuir para los quesos HAP a los 14 y 21 días; mientras tanto, la dureza de los quesos HTST permaneció sin cambio. De acuerdo a Lawrence *et al.* (1987) la textura de los quesos está primordialmente determinada por su pH y por la razón CN intacta: humedad. De esta manera, el incremento de firmeza observado durante los primeros días de almacenamiento debe relacionarse con la pérdida de humedad por sinéresis, fenómeno común en quesos frescos metaestables como el panela (Lobato-Calleros *et al.*, 2006).

TABLA 4.20 Evolución de dureza (Kg) en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	739.2 ± 152.0 ^{Aba}	804.6 ± 88.3 ^{Aa}	731.5 ± 95.1 ^{Aa}
7	867.7 ± 133.1 ^{Aa}	1104.0 ± 231.0 ^{Aa}	1079.0 ± 202.0 ^{Aa}
14	749.0 ± 156.5 ^{Aba}	945.0 ± 210.0 ^{Aab}	1178.9 ± 69.6 ^{Ab}
21	504.9 ± 151.2 ^{Ba}	780.3 ± 125.6 ^{Ab}	1076.2 ± 90.4 ^{Bc}

* N=4; **N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Se sabe que la textura de los quesos cambia marcadamente durante las primeras semanas de almacenamiento; en quesos madurados, se reporta un ablandamiento generalizado de la estructura por la hidrólisis de parte de α_{s1} CN por actividad remanente del cuajo, lo cual produce una reducción en la firmeza de la red de CNs (Walstra *et al.*, 2006). El ablandamiento posterior de la estructura del queso se

debe fundamentalmente a la actividad proteolítica de enzimas endógenas y exógenas, modulada por factores composicionales (contenido de humedad, proporción de humedad libre, razón sal: humedad, etc). La inclusión de proteínas de suero también afecta sensiblemente la dureza del queso, al permitir una mayor inclusión de agua en el producto, lo cual disminuye la fracción proteica y lubrica la matriz de CN en el queso (Zamora *et al.*, 2011). En el caso de los quesos HAP, la reducción en firmeza observada fue únicamente significativa ($p < 0.05$) para los quesos elaborados con leche tratada con PM de 210 MPa, a partir de los 14 d, a partir de cuando la dureza fue HTST > PM a 250 MPa > PM a 210 MPa. Considerando el uso de la HAP como promotor de lisis celular en productos fluidos, el mayor ablandamiento observado puede atribuirse a la liberación de contenidos celulares microbianos (incluyendo proteasas) por rompimiento de membrana como producto de las fuerzas de cizalla e impacto antes explicadas; esto fue más evidente en los quesos elaborados por PM de 210 MPa por el efecto aditivo de los pases aplicados (Diel *et al.*, 2006).

En la Tabla 4.21 se observan los cambios en cohesividad de quesos HAP y HTST. La cohesividad corresponde a la fuerza de los enlaces internos que constituyen el cuerpo del producto. En términos generales, esta propiedad fue sensiblemente más baja en magnitud (valor promedio en el rango de 0.18 a 0.38) para todos los quesos elaborados que la reportada en la bibliografía (0.62-0.84) para productos similares, tanto fabricados con leche pasteurizada como presurizada (Guerra-Martínez *et al.*, 2014; Sandra *et al.*, 2002). Un queso fresco menos cohesivo generalmente se correlaciona con una desmoronabilidad incrementada (Escobar *et al.*, 2011). No se observaron cambios significativos en la cohesividad de los quesos panela durante el almacenamiento refrigerado; los pequeños cambios de pH detectados en quesos elaborados con leche HTST puede relacionarse con una mayor disminución de pH; una reducción de pH en quesos se ha correlacionado con menores valores de cohesividad (Chen *et al.*, 1979). Por otra parte, la cohesividad difirió significativamente entre los tres tipos de queso, especialmente, entre los elaborados con leche HTST y HAP a PM de 250 MPa; la cohesividad fue mayor para los quesos HTST que para los HAP a todos los tiempos de almacenamiento. Esto se atribuyó a que la mayoría de quesos HAP

presentaron mayor fracturabilidad (observable como un pico de fuerza previo a la fuerza máxima durante el primer ciclo de compresión) que limitó la retención de forma del queso previo a la aplicación del segundo ciclo de compresión. Estos resultados difieren de los reportados por Kheadr *et al* (2002), donde un tratamiento de alta presión dinámica (5 pases de 200 MPa) de leche produjo quesos *Cheddar* más firmes y cohesivos que los elaborados con leche HTST a todos los tiempos de muestreo; asimismo, Zamora *et al.* (2011) reportan menores valores de fracturabilidad (medida mediante una prueba de compresión uniaxial) en quesos elaborados con leche HAP a 300 MPa. Considerando esto, se estima que el uso de PM modifica la estructura de la matriz proteica, interfiriendo con la formación de una red tridimensional más firme y menos fracturable.

TABLA 4.21 Evolución de cohesividad en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	0.252 ± 0.022 ^{Aa}	0.184 ± 0.031 ^{Aa}	0.381 ± 0.052 ^{Ab}
7	0.272 ± 0.010 ^{Aab}	0.220 ± 0.052 ^{Aa}	0.292 ± 0.008 ^{Ab}
14	0.262 ± 0.032 ^{Aa}	0.179 ± 0.019 ^{Ab}	0.324 ± 0.020 ^{Ac}
21	0.267 ± 0.039 ^{Aab}	0.185 ± 0.029 ^{Aa}	0.314 ± 0.073 ^{Ab}

* N=4; **N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

La evolución de la elasticidad instrumental de quesos elaborados con leche tratada por PM de HAP y HTST se muestra en la Tabla 4.22. No se observaron diferencias significativas en elasticidad debido al tratamiento ni cambios significativos durante el almacenamiento refrigerado de los quesos. La elasticidad de quesos frescos depende tanto del pH de la cuajada como de la magnitud de remoción de fosfato de calcio coloidal (Lawrence *et al.*, 1987). Los valores promedio de elasticidad estuvieron

en los rangos de (0.90-1.05), (0.86-1.03) y (0.94-1.08) para los quesos elaborados con leche tratada por PM de HAP a 210 MPa, a 250 MPa y HTST, respectivamente. Estos se asemejan a los reportados por Guerra-Martínez *et al.* (2014) para quesos panela elaborados con leche pasteurizada (0.81-0.95).

TABLA 4.22 Evolución de elasticidad en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	1.050 ± 0.083 ^{Aa}	0.959 ± 0.139 ^{Aa}	0.968 ± 0.057 ^{Aa}
7	0.900 ± 0.060 ^{Aa}	1.029 ± 0.211 ^{Aa}	1.083 ± 0.069 ^{Aa}
14	1.035 ± 0.119 ^{Aa}	0.860 ± 0.067 ^{Aa}	0.944 ± 0.052 ^{Aa}
21	0.966 ± 0.118 ^{Aa}	0.893 ± 0.154 ^{Aa}	1.000 ± 0.049 ^{Aa}

* N=4; N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

Los cambios en parámetros de color durante el almacenamiento refrigerado (4°C) de los quesos panela elaborados se presentan en las Tablas 4.23- 4.28. Los tratamientos a PM de HAP variaron levemente el color de los productos. Las variaciones más relevantes se presentaron en luminosidad (Tabla 4.23) la cual se redujo para todos los quesos durante el almacenamiento refrigerado, aunque sólo fue estadísticamente significativa para los quesos HAP. Además, a partir de los 7 d, el valor de L para los quesos elaborados con leche presurizada fue menor (significativa hasta los 21 d de almacenamiento). Por su parte, los parámetros *b* (Tabla 4.25), *hue* (Tabla 4.26) y cromaticidad (Tabla 4.27) no variaron significativamente ni en función del pretratamiento de leche ni del tiempo de almacenamiento para el mismo tipo de queso, excepto a los 21 días, donde el queso elaborado con leche tratada a PM de 250 MPa exhibió valores significativamente menores (p<0.05) de estos tres últimos parámetros en relación con el queso HTST. En cuanto al parámetro *a* (Tabla 4.24) éste

Resultados y discusión

fue menor para los quesos HAP, aunque sólo significativamente para el queso HAP a 210 MPa al día 1). De acuerdo a Zamora *et al.* (2011) el color en queso resulta de la luz que penetra las capas superficiales del producto y es dispersada por GG y bolsas de suero; en quesos HAP al día 1, la reducción en tonos rojizos (menores valores de *a*) es causada por la pérdida de la capacidad de dispersión de luz de los GG al reducir sensiblemente su tamaño. Sin embargo, este fenómeno debió ser acompañado por un incremento en *L*, lo cual únicamente se observó para los quesos elaborados con leche tratada por PM a 210 MPa, probablemente debido a la incorporación de PS; los quesos con alto contenido de proteínas de suero generalmente son más opacos (p.e. queso Ricotta) y tienden a desarrollar tonos levemente verdosos por la presencia de riboflavina. Saldo *et al.* (2002) también observaron una disminución de luminosidad durante el almacenamiento de quesos procesados con AP a 400 MPa, atribuyéndolo a la mayor proporción de humedad de éstos en comparación con quesos de leche HTST; sin embargo, además reportaron un incremento en la cromacidad, principalmente relacionado con los valores del parámetro *b** (color amarillo).

TABLA 4.23 Evolución de *L* en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	89.20 ± 1.28 ^{Aa}	86.37 ± 1.15 ^{Ab}	87.77 ± 0.19 ^{Aab}
7	85.71 ± 1.50 ^{Ba}	85.78 ± 0.99 ^{Aa}	87.36 ± 1.97 ^{Aa}
14	84.08 ± 1.70 ^{Ba}	84.50 ± 0.23 ^{ABa}	86.39 ± 1.71 ^{Aa}
21	84.55 ± 1.06 ^{Bab}	82.70 ± 1.57 ^{Ba}	85.03 ± 0.68 ^{Ab}

* N=4; **N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los valores de *C**, los cuales están en función de los parámetros *a* y *b*, de los quesos elaborados indican una mayor contribución de *b*, de forma similar a lo reportado

Resultados y discusión

por Zamora *et al.* (2011), quienes determinaron valores de cromaticidad de 8.59 y 12.12 en quesos tipo panela elaborados con leches HAP a 300 MPa y HTST, respectivamente; asimismo, los mismos investigadores reportan valores de *hue* (tono) en el rango de 1.5-1.6 radianes, ligeramente mayor de los valores en el rango de 1.05-1.1 obtenidos en el presente proyecto y correspondientes a un tono amarillo (~60°).

TABLA 4.24 Evolución de *a* en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	1.38 ± 0.24 ^{Aa}	1.79 ± 0.10 ^{Ab}	2.03 ± 0.14 ^{Ab}
7	1.98 ± 0.21 ^{Aba}	2.48 ± 0.26 ^{Aa}	2.67 ± 0.51 ^{Aa}
14	2.41 ± 0.18 ^{Ba}	2.38 ± 0.39 ^{Aa}	2.43 ± 0.41 ^{Aa}
21	2.16 ± 0.42 ^{Aba}	2.32 ± 0.54 ^{Aa}	2.53 ± 0.53 ^{Aa}

* N=4; **N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

TABLA 4.25 Evolución de *b* en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	15.93 ± 1.47 ^{Aa}	15.76 ± 1.06 ^{Aa}	16.04 ± 0.54 ^{Aa}
7	16.91 ± 1.14 ^{Aa}	15.61 ± 2.30 ^{Aa}	17.56 ± 0.61 ^{Aa}
14	17.25 ± 0.73 ^{Aa}	17.21 ± 1.61 ^{Aa}	16.75 ± 1.53 ^{Aa}
21	15.76 ± 0.75 ^{Aab}	14.86 ± 1.07 ^{Aa}	17.49 ± 1.00 ^{Ab}

* N=4; **N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa (p<0.05)

Se esperaría que el desuerado durante el almacenamiento y la consecuente concentración de componentes sólidos en el queso provocara un incremento en C^* , de manera análoga a lo observado por Saldo *et al.* (2002). Sin embargo, estos valores no tuvieron un comportamiento regular a lo largo del almacenamiento, como se observa en la Tabla 4.27.

TABLA 4.26 Evolución de *hue* (radianes) en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	1.06 ± 0.06 ^{Aa}	1.05 ± 0.06 ^{Aa}	1.04 ± 0.02 ^{Aa}
7	1.09 ± 0.04 ^{Aa}	1.05 ± 0.10 ^{Aa}	1.07 ± 0.03 ^{Aa}
14	1.09 ± 0.03 ^{Aa}	1.09 ± 0.05 ^{Aa}	1.05 ± 0.05 ^{Aa}
21	1.06 ± 0.02 ^{Aab}	1.00 ± 0.05 ^{Aa}	1.09 ± 0.01 ^{Ab}

* N=4; **N=8

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

TABLA 4.27 Evolución de índice cromaticidad (C^*) en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. HTST tras 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *	HTST**
1	13.63 ± 1.84 ^{Aa}	13.92 ± 1.26 ^{Aa}	14.18 ± 0.62 ^{Aa}
7	15.38 ± 1.57 ^{Aa}	15.62 ± 2.33 ^{Aa}	16.22 ± 0.64 ^{Aa}
14	16.15 ± 1.06 ^{Aa}	16.06 ± 2.00 ^{Aa}	15.35 ± 2.06 ^{Aa}
21	14.16 ± 1.10 ^{Aab}	13.58 ± 1.21 ^{Aa}	16.36 ± 1.43 ^{Ab}

* N=4; **N=8.

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

Finalmente, ΔE entre los quesos HAP y los HTST a diferentes tiempos de almacenamiento se muestra en la Tabla 4.28. No se detectaron diferencias entre ambos tipos de quesos elaborados con leche HAP, al compararse con el control (HTST). Tomando en cuenta los factores que condicionan el color del producto, se estima que los quesos elaborados con leche tratada a PM de HAP presentaban similitudes estructurales que se vieron reflejadas en características de color muy semejantes, mismas que no difirieron en gran medida del control. Los valores de ΔE son parecidos a los reportados por Zamora *et al* (2011) (3.61) en productos similares.

TABLA 4.28 Evolución de ΔE en quesos panela elaborados con leche tratada a PM de HAP vs. HTST durante 21 días de almacenamiento refrigerado

Tiempo de almacenamiento (d)	210 MPa, 5 Pases *	250 MPa, 4 Pases *
1	2.24 ± 0.91 ^{Aa}	1.82 ± 0.70 ^{Aa}
7	2.39 ± 0.54 ^{Aa}	2.90 ± 0.80 ^{Aa}
14	2.36 ± 1.38 ^{Aa}	2.41 ± 1.04 ^{Aa}
21	2.48 ± 0.92 ^{Aa}	3.75 ± 1.51 ^{Aa}

* N=4

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila representan una diferencia significativa ($p < 0.05$)

4.5 Análisis sensorial de leche y queso panela HAP

4.5.1 Selección de panel

De los candidatos originales (n=25) se eligieron 8 panelistas (7 mujeres, 1 hombre) tras obtener resultados satisfactorios en la prueba de evaluación y que pasaron del área de incertidumbre del análisis secuencial (ver ejemplo en Anexo de la sección 4.5).

4.5.2 Análisis descriptivo de leches HAP y HTST

Los resultados de los análisis descriptivos de leche y queso se describen a continuación.

4.5.2.1 Análisis descriptivo de aroma de leches HAP y HTST

Los jueces emplearon once atributos de aromas para describir la fracción volátil de leches tratadas por PM de HAP y HTST. La calificación promedio de intensidad de los atributos de aroma evaluados se muestra en la Figura 4.16.

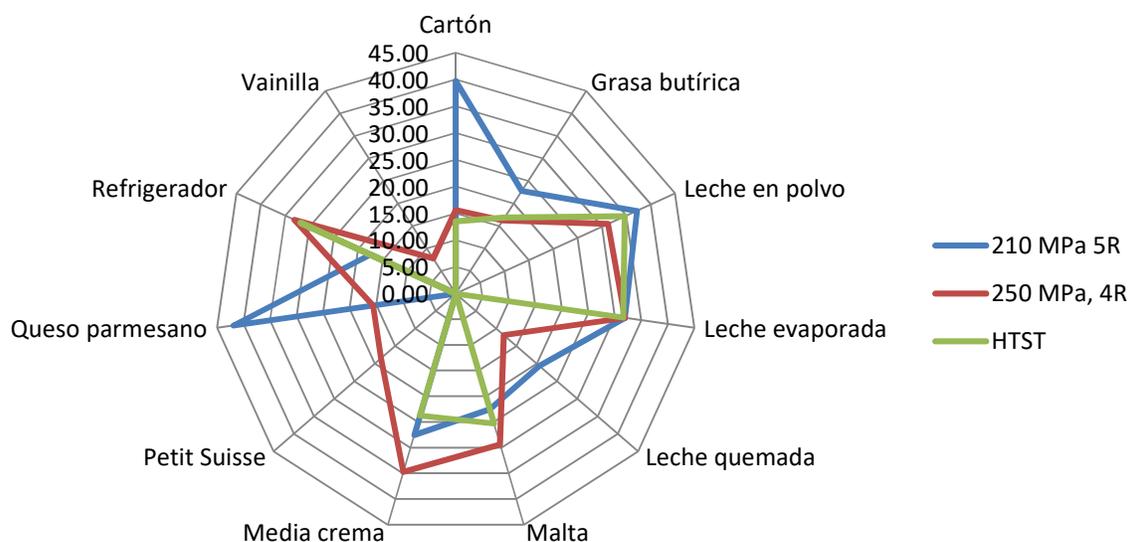


FIGURA 4.16 Perfiles de aromas de leches tratadas por HTST y PM de HAP

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

El análisis de los datos requirió del cálculo de dos factores para describir las muestras en su totalidad. A partir de estos factores se generaron los gráficos de componentes principales bidimensionales y se eligió el que aportara más del 80% (100%) de la descripción total. En la Tabla 4.29 se muestran los valores propios de cada factor, el porcentaje de la varianza para cada uno de ellos y el porcentaje acumulado.

TABLA 4.29 Valores propios de factores para variables de aroma de leche

	F1	F2
Valor propio	838.366	202.649
% varianza	80.533	19.467
% acumulado	80.533	100.000

Como puede observarse, el factor 1 por si mismo aporta 80.53% del total de la información, por lo que se trata del componente con mayor importancia. El factor 2 confiere 19.467% de la descripción, con lo que el valor acumulado de los dos primeros factores proporciona el 100% de la descripción total de las leches tratadas bajo los dos procesos antes descritos. En un gráfico de análisis de componentes principales (ACP) es posible visualizar los atributos de aroma que describen a la muestra en mayor medida, así como la importancia de cada descriptor y relaciones existentes entre los mismos. En la Figura 4.17 se representa el ACP bidimensional de leches tratadas por los tres tipos de proceso; cada una se encuentra relacionada con un número de atributos que caracterizan a los procesos térmico (HTST) y emergentes (PM de HAP). Las leches se destacaron por poseer una mayor intensidad de aromas a queso parmesano, cartón, grasa butírica y leche quemada, y en mínima proporción refrigerador y malta. Es posible observar que los atributos que caracterizan a cada una de las leches analizadas varían notablemente. La leche HTST se caracterizó por no presentar una característica en particular, así que está descrita por los once atributos de aroma, sin manifestar mayor intensidad en alguno de ellos. La leche HAP 250, 4 pases (HAP 250, 4R) se caracterizó por desarrollar mayormente aroma a vainilla y queso tipo *petite suisse*, seguido de malta y en menor intensidad a refrigerador, mientras que la leche tratada por 5 pases de HAP a 210 MPa (HAP 210, 5R) exhibió aromas a cartón y grasa butírica en alta intensidad, en mediana intensidad a queso parmesano, leche quemada y leche en polvo, y en baja intensidad a leche evaporada y media crema. Los descriptores vainilla, *petit suisse*, malta y refrigerador son inversamente proporcionales a los atributos cartón, grasa butírica y leche en polvo. En la Tabla 4.30 se resume la descripción anterior.

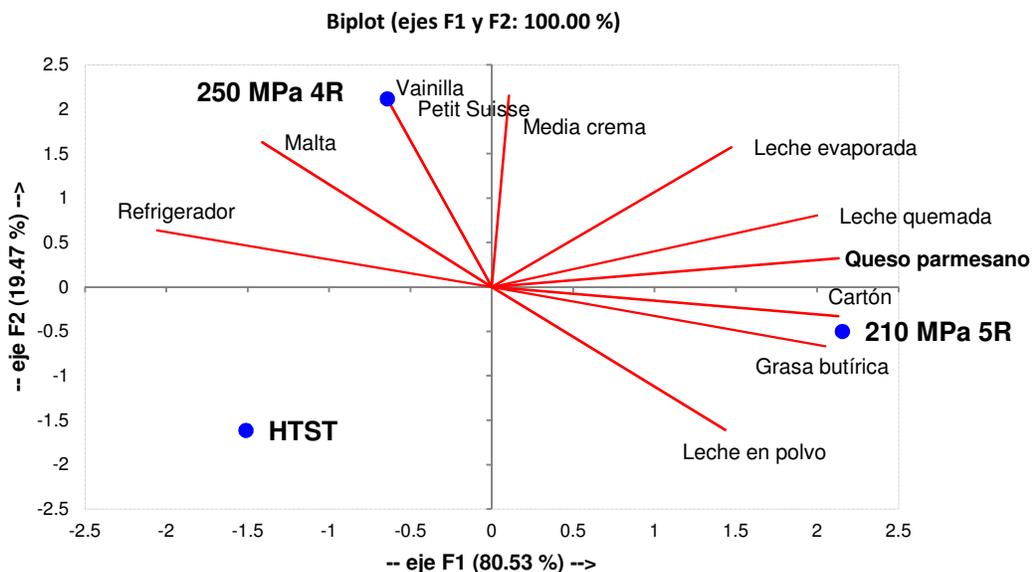


FIGURA 4.17 ACP en aromas de leches tratadas por HTST y PM de HAP

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

TABLA 4.30 Características aromáticas de leche tratada por PM de HAP

Leche	Mayor intensidad	Mediana intensidad	Menor intensidad
HAP 250 4R	Vainilla, petit suisse	Malta	Refrigerador
HAP 210 5R	Cartón, grasa butírica	Queso parmesano, leche quemada, leche en polvo	Leche evaporada, media crema

Para la leche tratada a PM de HAP a 210 MPa, los aromas a cartón generalmente se relación con procesos de oxidación lipídica (Walstra *et al.*, 2006) lo cual a su vez puede estar relacionado con actividad residual de lactoperoxidasa (LPO) en leche; Pereda *et al.* (2007) establecieron que tratamientos de HAP a 200 MPa (1 pase, Ti=30°C) mantenían en promedio aproximadamente un 30% de la actividad de LPO; esto, aunado a un incremento sustancial de la superficie específica de GG

pueden ser factores que incidan sobre el desarrollo de aromas a oxidado y en menor medida, a grasa butírica. Por otra parte, Vázquez-Landaverde *et al* (2006) establece que el aroma a leche quemada se relaciona con la generación de productos sulfurados como H₂S; la aparición de descriptores de esta naturaleza se relaciona con el intenso calentamiento concomitante al proceso de HAP. El aroma a malteado, a su vez, se la ha relacionado frecuentemente como similar al olor a cocido. Por otra parte, para la leche tratada a PM de HAP a 250 MPa, los aromas fueron menos objetables, aunque también diferentes a los de la leche HTST; los aromas a fermentado/frutal relacionados con el queso *petit suisse* pueden atribuirse a crecimiento de psicrótrofos, lo cual se considera está relacionado con contaminación postproceso. Pereda *et al* (2008a) reportaron que procesos selectos de HAP generaron cambios en el perfil aromático de leche al compararse con su contraparte pasteurizada, observando incrementos en el contenido de compuestos volátiles con grupos carbonilo, en particular aldehídos, relacionados con procesos de autooxidación, a P=300 MPa, mientras que a P=200 MPa se observó un repunte en la concentración de compuestos asociados a rancidez.

4.5.2.2 Análisis descriptivo de gustos de leches HAP y HTST

Los perfiles de gustos de estos productos se muestran en la Figura 4.18. Para el ACP, el análisis de los datos requirió del cálculo de dos factores para describir las muestras en su totalidad. En la Tabla 4.31 se muestran los valores propios de cada factor y el porcentaje de la varianza para cada uno de ellos, así como el porcentaje acumulado. Como puede observarse, por si solo el factor 1 aporta 77.570% del total de la información, siendo el de mayor importancia. El factor 2 confiere 22.430% de la descripción y por ello el valor acumulado de ambos proporciona el total de la descripción de las muestras evaluadas. En la Figura 4.19 se representa el ACP bidimensional en gustos de quesos elaborados. Las leches se describieron mediante diecisiete gustos en general: agrio, amargo, astringente, crema ácida, crema para batir, dulce, fermentado, leche cocida, metálico, oxidado, plástico, procesado, queso crema, queso fresco, suero, yogurt y jabón. Los gustos a oxidado, agrio, amargo, metálico,

plástico y jabón fueron los que se presentaron en mayor intensidad, seguidos de crema ácida y queso fresco y con mínimos gustos a fermentado, yogurt y suero.

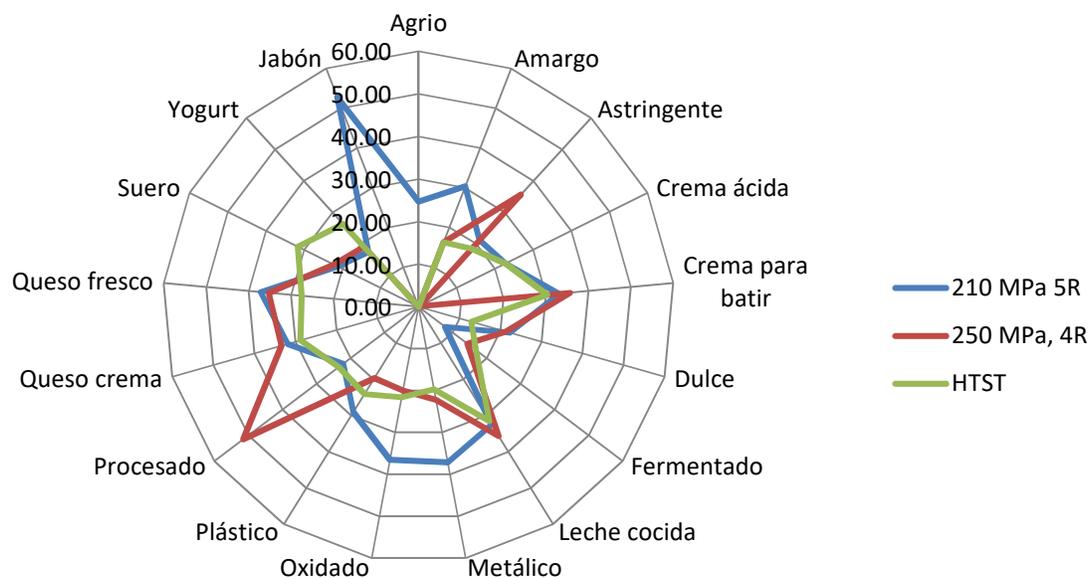


FIGURA 4.18 Perfiles de gustos de leches tratadas por HTST y PM de HAP

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

TABLA 4.31 Valores propios de factores para variables de gustos de leche

	F1	F2
Valor propio	1605.875	464.340
% varianza	77.570	22.430
% acumulado	77.570	100.000

La leche HTST se caracterizó por presentar gusto con mayor intensidad a suero y yogurt, y en menor intensidad a fermentado. Para la leche tratada a PM de HAP a 210 MPa presentó gustos en mayor intensidad a jabón, amargo, agrio, oxidado y metálico; en una intensidad media plástico y queso fresco y en menor intensidad los

Resultados y discusión

atributos crema ácida, dulce y queso crema. Por su parte, la leche HAP a 4 pases de 250 MPa, solo presentó gustos en mayor intensidad a astringente y procesado, en mediana intensidad a leche cocida y en menor intensidad a crema para batir. En la Tabla 4.32 se resume lo anterior. Es importante mencionar que los descriptores procesado, astringente, leche cocida y crema para batir son inversamente proporcionales a crema y plástico; lo mismo sucede con los descriptores queso crema, dulce, queso fresco, metálico, jabón, agrio, amargo y oxidado, que son opuestos a fermentado, yogurt y suero. En términos generales se observa que, al igual que para el análisis de aromas, el gusto de la leche tratada a PM de 250 MPa exhibió atributos considerablemente más agradables que la leche procesada a PM de HAP a 210 MPa. Los gustos a jabón y amargo se asocian con procesos de rancidez, mientras que los metálicos y oxidados se relacionan entre sí; ambos provienen de procesos de deterioro de grasa butírica; por su parte, el gusto amargo puede asociarse de igual manera a sabores rancios, aunque también puede provenir deterioro proteolítico.

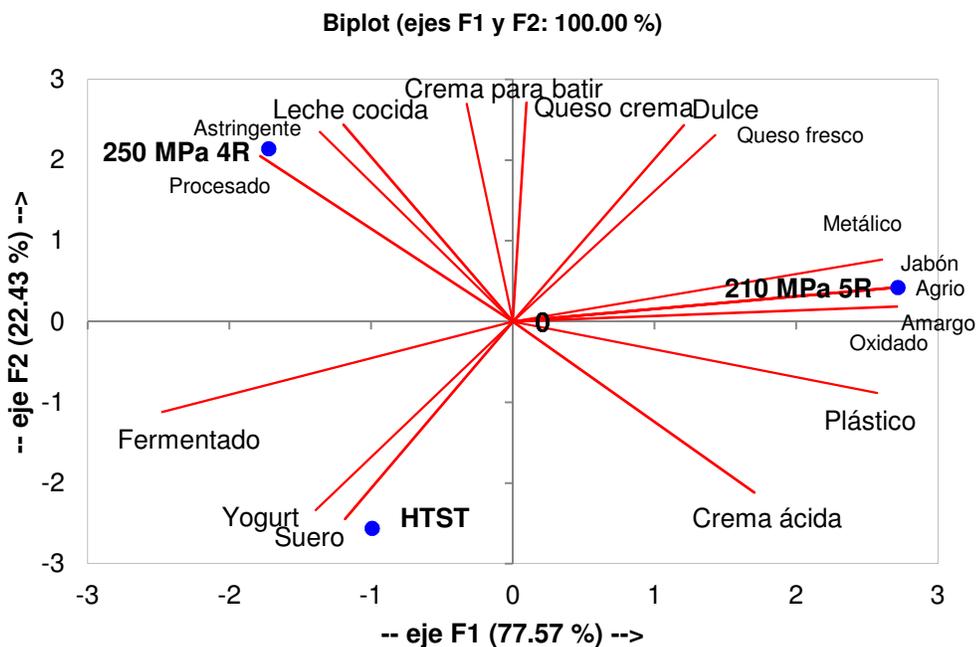


FIGURA 4.19 ACP en gustos de leches tratadas por HTST y PM de HAP

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

(Álvarez, 2009). Pereda *et al.* (2008c) estudiaron los cambios en lipólisis y oxidación lipídica de leche HAP (un pase a 200 y 300 MPa, con $T_i=30$. 40°C) comparada con leche HTST. Los tratamientos a 300 MPa presentaron el mayor grado de deterioro lipídico, lo cual se asumió estaba causado por un recubrimiento insuficiente de los GG al existir una cantidad limitada de CN, la cual generalmente protege a los lípidos contra este tipo de reacciones. La mayor percepción de defectos asociados con deterioro lipídico en leche HAP a 210 MPa puede deberse a una mayor acumulación de productos secundarios de oxidación, como malondialdehído y hexanal. Por su parte, los gustos rancios se han descrito como causados por la presencia de ácido hexanoico (Pereda *et al.*, 2008a). Las notas astringentes detectadas en leche tratada a 250 MPa puede asociarse con gustos rancios muy tenues (Álvarez, 2009), que reflejen una menor magnitud de deterioro hidrolítico.

TABLA 4.32 Características en gustos de leche tratada por HTST o PM de HAP

Leche	Mayor intensidad	Mediana intensidad	Menor intensidad
HTST	Suero, yogurt		Fermentado
250 MPa, 4R	Astringente, procesado	Leche cocida	Crema para batir
210 MPa, 5R	Jabón, amargo, agrio, oxidado y metálico	Queso fresco	Queso crema

4.5.2.3 Análisis descriptivo de sensación bucal de leches HAP y HTST

El análisis de los datos requirió del cálculo de dos factores para describir las muestras en su totalidad. En la Tabla 4.33 se muestran los valores propios de cada factor y el porcentaje de la varianza para cada uno de ellos, así como el porcentaje acumulado. Como puede observarse, por si solo el factor 1 aporta 83.666% del total

de la información. El factor 2 confiere 16.334% de la descripción, por ello el valor acumulado de los dos factores proporciona el total de la descripción de los quesos procesados. En la Figura 4.20 se representa el ACP bidimensional en sensación bucal de las leches evaluadas. Las leches se describen mediante dos términos de sensación bucal en general: sensación cremosa (*creamy mouthfeel*) y sensación oleosa (*oily mouthfeel*), el primero percibido en mayor intensidad que el segundo. Los tratamientos aplicados afectaron significativamente la percepción bucal de la leche. Se puede observar que la leche HTST presenta una alta intensidad en sensación oleosa, mientras que para leche HAP a 250 MPa la principal característica fue sensación cremosa y la leche 210 5R no se distinguió por ninguna característica predominante, es decir, se define por ambos atributos. Las leches HAP presentaron una mayor cremosidad; la evaluación sensorial de cremosidad es compleja y se ha relacionado con tersura, viscosidad e incluso con la presencia de sabores específicos (Jellema *et al.*, 2005). La mayor cremosidad exhibida por las leches HAP probablemente se relacione con una mayor viscosidad causada por un incremento en la interacción entre CNs y PS a través de la formación de complejo BLG-KCN. Estos cambios conformacionales proteicos pueden incrementar la viscosidad de leche dado que las micelas de CN asociadas con BLG se convierten en partículas de formas irregulares, con volúmenes netos de rotación más grandes (Huppertz *et al.*, 2003)

TABLA 4.33 Valores propios de factores para sensación bucal de leche

	F1	F2
Valor propio	68.523	13.378
% varianza	83.666	16.334
% acumulado	83.666	100.000

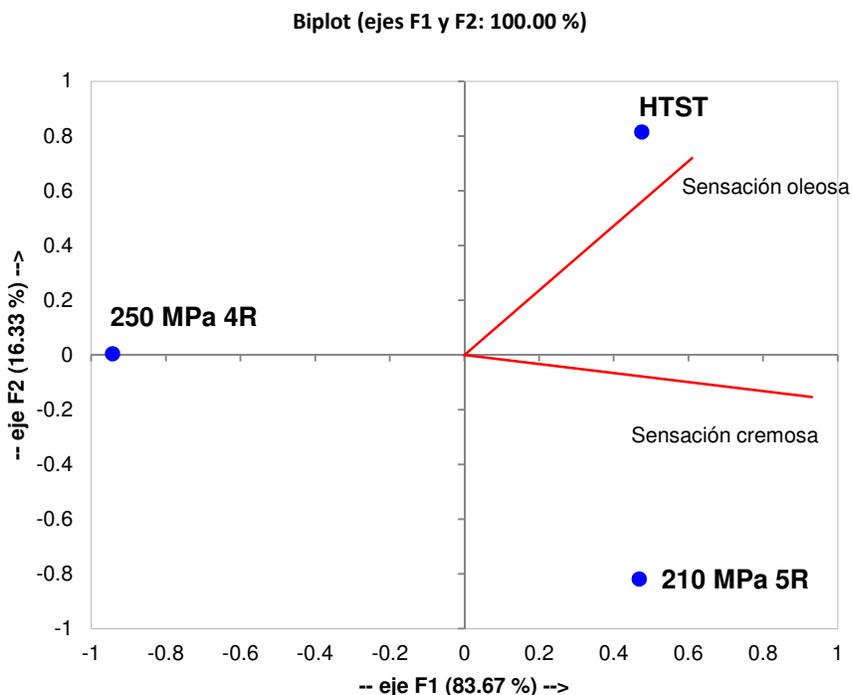


FIGURA 4.20 ACP en sensación bucal de leches tratadas por HTST y PM de HAP

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

4.5.3 Análisis descriptivo de quesos elaborados con leche HTST y tratada por PM de HAP

Los resultados de los parámetros evaluados en quesos elaborados con leche tratada a PM de HAP o HTST se describen a continuación.

4.5.3.1 Análisis descriptivo de aromas de quesos elaborados con leche HAP y HTST

Los perfiles de aromas de quesos elaborados con leches HTST y tratadas por PM de HAP se muestran en la Figura 4.21, pudiendo observarse diferencias importantes en los descriptores característicos para cada tipo de queso.

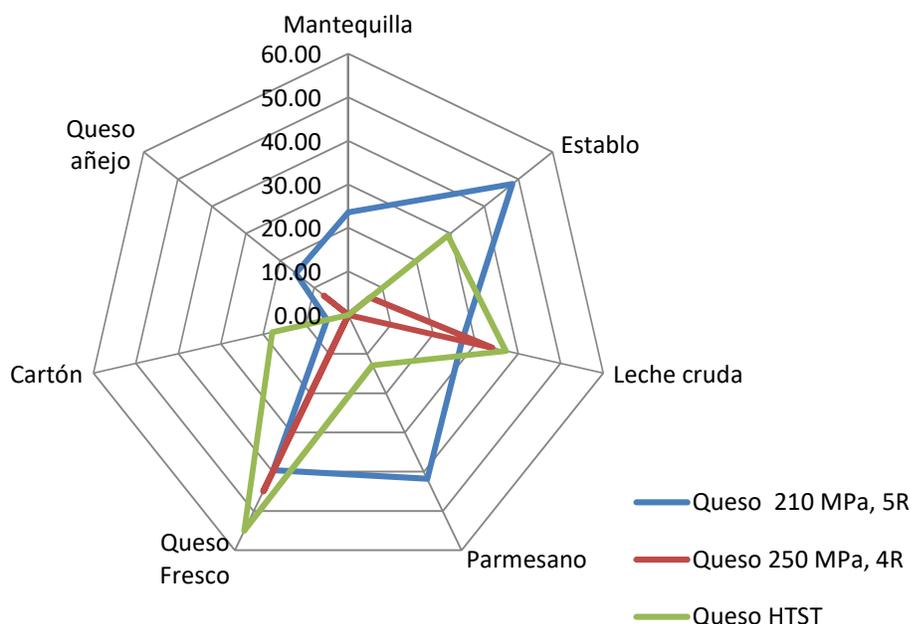


FIGURA 4.21 Perfiles de aromas de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

Para el análisis de aromas en quesos HAP y HTST, los jueces emplearon siete atributos para describir la fracción volátil de queso tratados por HAP Y HTST. El análisis de los datos requirió del cálculo de dos factores para describir las muestras en su totalidad. A partir de estos factores se generaron los gráficos de componentes principales bidimensionales y se eligió el que aportara más del 80% (100%) de la descripción total. En la Tabla 4.34 se muestran los valores propios de cada factor, el porcentaje de varianza para cada uno de ellos y el porcentaje acumulado.

TABLA 4.34 Valores propios de factores para variables de aroma de queso

	F1	F2
Valor propio	1098.661	215.157
% varianza	83.623	16.377
% acumulado	83.623	100.000

Como se observa en la tabla anterior, por si mismo el factor 1 aporta 83.623% del total de la información, mientras que el factor 2 confiere 16.377% de la descripción; por ello el valor acumulado de los dos primeros factores proporciona el 100% de la descripción total de los quesos tratados bajo dos procesos distintos. En un gráfico de componentes principales es posible visualizar los atributos de aroma que principalmente describen a la muestra, así como la importancia de cada descriptor y la relación existente entre los mismos. En la Figura 4.22 se representa el ACP bidimensional de los quesos tratados por los procesos antes descritos. Cada queso se encuentra relacionado con un número de atributos que caracterizan a dicho proceso.

Los quesos se destacaron por poseer aromas en mayor intensidad de parmesano, mantequilla, establo y queso añejo, y en menor proporción leche cruda, queso fresco y cartón. El queso HTST se caracterizó por presentar aromas a queso fresco, leche cruda y cartón. El queso HAP 210 5R se caracterizó por desarrollar mayormente el aroma a establo, queso parmesano, mantequilla y queso añejo, mientras que el queso HAP con 4 pases de 250 4R no presentó una característica en particular, es decir, que este queso se describe con los siete atributos de aroma, sin manifestar mayor intensidad en alguno de ellos. Es importante mencionar que los descriptores queso fresco y leche cruda son inversamente proporcionales a los atributos mantequilla y queso añejo. Además, el descriptor queso parmesano se localiza en el factor 1, implicando que es este atributo el que proporciona el efecto de mayor intensidad e importancia a dicho factor. Lo mismo se observa con el atributo cartón el cual se encuentra muy cercano al factor 2. En la Tabla 4.35 se resume la descripción anterior. De acuerdo a Caro *et al.* (2014) los aromas característicos de queso panela son cocido, amargo y a mantequilla; por otra parte, por su naturaleza el aroma a queso fresco era esperado (notas a suero dulce y leche fresca); los quesos evaluados presentaron algunos de estos aromas; sin embargo, tanto para el queso HTST como para el HAP a 210 MPa se detectaron aromas no característicos, incluyendo respectivamente cartón (relacionado con aromas a oxidado) y quesos madurados (probablemente asociados con aromas de productos de reacciones de proteólisis y lipólisis).

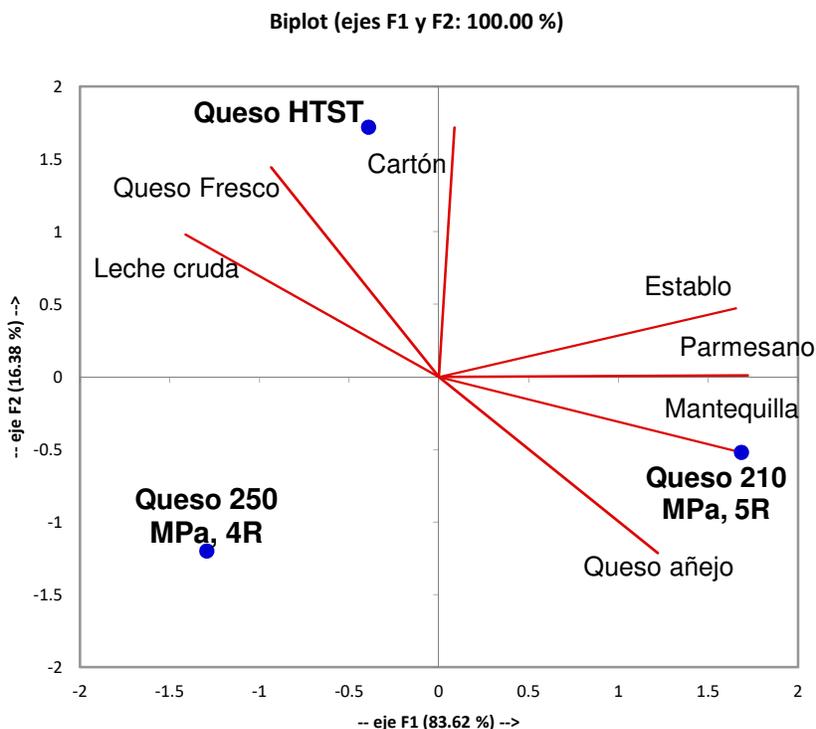


FIGURA 4.22 ACP en aromas de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

TABLA 4.35 Características en aromas de quesos HAP y HTST

Queso	Mayor intensidad	Mediana intensidad	Menor intensidad
HTST	Cartón	Queso fresco	Leche cruda
250 MPa, 4R*			
210 MPa, 5R	Mantequilla	Parmesano	Queso añejo

*Descrita por los siete atributos de aroma

4.5.3.2 Análisis descriptivo de gustos de quesos elaborados con leche HAP y HTST

Los perfiles de gustos de quesos elaborados con leches HTST y tratadas por PM de HAP se muestran en la Figura 4.23. El análisis de los datos para definir los componentes principales requirió del cálculo de dos factores para describir las muestras en su totalidad. En la Tabla 4.36 se muestran los valores propios de cada factor y el porcentaje de la varianza para cada uno de ellos, así como el porcentaje acumulado.

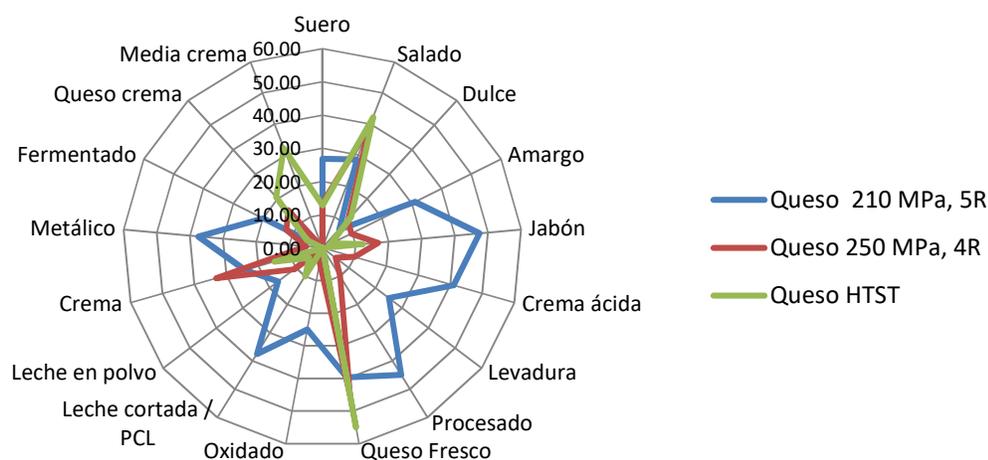


FIGURA 4.23 Perfiles de gustos de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

TABLA 4.36 Valores propios de factores para variables de gustos de leche

	F1	F2
Valor propio	3184.172	374.969
% varianza	89.465	10.535
% acumulado	89.465	100.000

Resultados y discusión

Como se observa en la tabla anterior, por si solo el factor 1 aporta 89.465% del total de la información, mientras tanto, el factor 2 confiere 10.535% de la descripción; por ello el valor acumulado de los dos factores proporciona el total de la descripción de los quesos procesados. En la Figura 4.24 se representa el ACP bidimensional en gustos de los quesos elaborados. Los quesos se describieron mediante diecisiete gustos en general: suero salado, dulce, amargo, jabón, crema ácida, levadura, procesado, queso fresco, oxidado, leche cortada / pcl, leche en polvo, crema, metálico, fermentado, queso crema y media crema. Asimismo, se distingue por poseer mayor intensidad en gusto crema, dulce, vainilla, *oily mouthfeel* y *creamy mouthfeel* y mínimo gusto a *salado, jabón y amargo*. El queso HTST se caracterizó por presentar un gusto en mayor intensidad a media crema y en menor intensidad a dulce y queso crema. Para el queso HAP 210 presentó gustos en mayor intensidad a Suero y metálico, en intensidad media a jabón y oxidado, y en menor intensidad los atributos leche cortada/PCL. El queso HAP 250 solo presentó un descriptor característico en baja intensidad y fue el descriptor crema. Es importante mencionar que los descriptores media crema, queso fresco, queso crema y dulce son opuestos a los descriptores crema, fermentado, leche en polvo, procesado, crema ácida y amargo. En la Tabla 4.37 se resume lo anteriormente expuesto. Caro *et al.* (2014) establecen que los quesos Panela exhiben sabores predominantemente dulces, ácidos y salados, con características leves de amargor y pungencia. Los quesos HTST evaluados presentaron sabores similares a los antes mencionados; por su parte el queso HAP a 210 MPa fue descrito empleando características desagradables, relacionadas con procesos de oxidación, probablemente causados por deterioro de grasa butírica y que eran de naturaleza similar a las descritas previamente con leche HAP a esas condiciones. Nuevamente, de manera similar a las evaluaciones de leche, el perfil sensorial de quesos HAP a 250 MPa fue mejor que el de su contraparte elaborado con leche tratada a menor P y mayor NP.

4.5.3.3 Análisis descriptivo de textura de quesos elaborados con leche HAP y HTST

Los perfiles de textura de quesos panela elaborados con leches HTST y tratadas por PM de HAP se muestran en la Figura 4.25. Por su parte, el análisis de los datos requirió del cálculo de dos factores para describir las muestras en su totalidad. En la Tabla 4.38 se muestran los valores propios de cada factor y el porcentaje de la varianza para cada uno de ellos, así como el porcentaje acumulado.

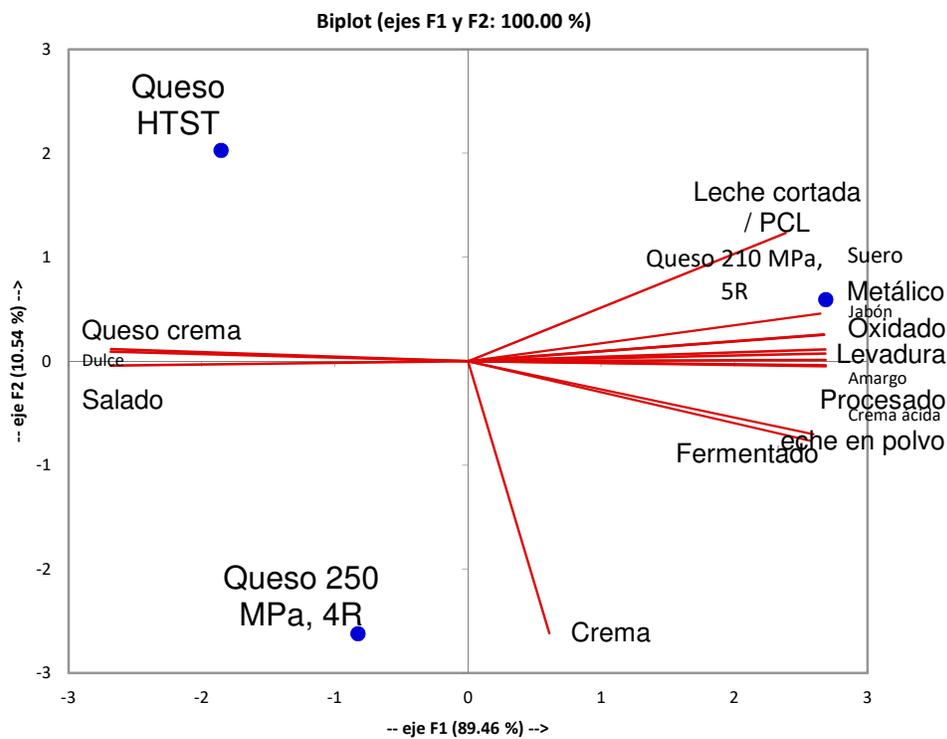


FIGURA 4.24 ACP en gustos de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

TABLA 4.37 Características en gustos de quesos HAP vs HTST

Queso	Mayor intensidad	Mediana intensidad	Menor intensidad
HTST	Media crema		Queso crema, dulce
HAP 250 4R			Crema
HAP 210 5R	Suero, metálico	Jabón, oxidado	Leche cortada/PCL

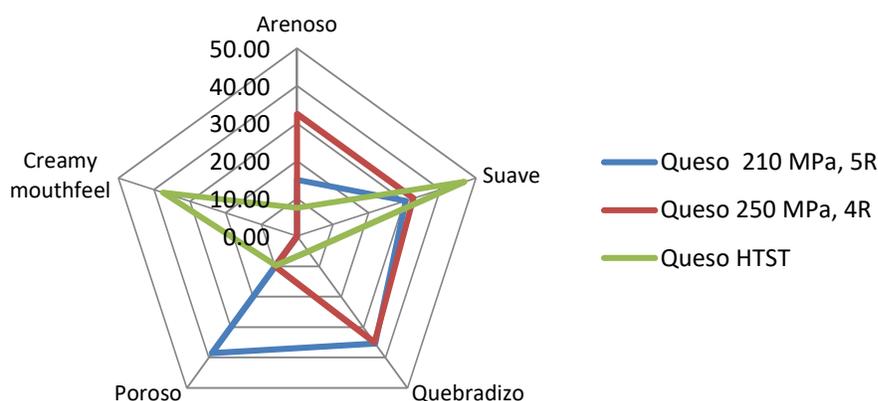


FIGURA 4.25 Perfiles de textura de quesos panela elaborados con leches tratadas por HTST y PM de HAP HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

TABLA 4.38 Valores propios de factores para variables de textura de quesos Panela

	F1	F2
Valor propio	1014.031	278.231
% varianza	78.469	21.531
% acumulado	78.469	100.000

Resultados y discusión

Como se observa en la tabla previa, por si solo el factor 1 aporta 78.469% del total de la información, mientras que el factor 2 confiere 21.531% de la descripción, de los quesos, por ello el valor acumulado de los dos factores proporciona el total de su descripción. En la Figura 4.26 se representa el ACP bidimensional en textura para estos productos. Estos se describen mediante cinco términos de textura en general: arenoso, suave, quebradizo, poroso y *sensación cremosa*. Además, se distingue por poseer una sensación cremosa en mayor intensidad, mientras que la textura quebradiza se presenta en menor intensidad en los tres. Los descriptores *arenoso* y *quebradizo* son inversamente proporcionales a *creamy mouthfeel*, mientras que poroso es inversamente proporcional a suave. Es posible observar que el queso HTST presenta una intensidad alta en el atributo *creamy mouthfeel* seguido de una intensidad menor en el atributo suave. Para el queso HAP a 250 MPa la principal característica de textura fue arenosa seguida de quebradizo. Finalmente, para el queso HAP a 210 MPa, el atributo presente en mayor intensidad fue poroso.

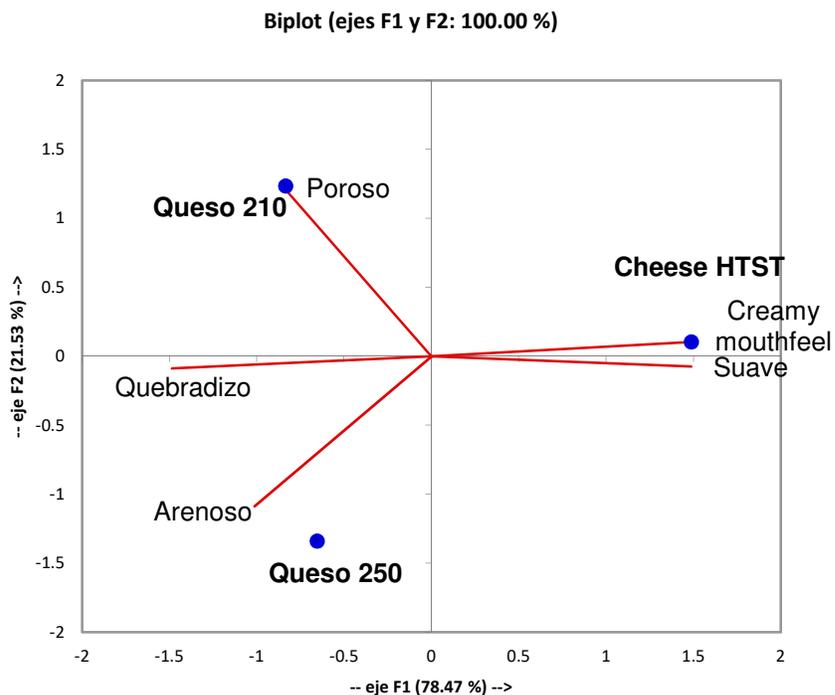


FIGURA 4.26 ACP de textura de quesos HAP vs HTST

HTST= Leche pasteurizada; 250 MPa, 4R= Leche HAP con 4 pases de 250 MPa; 210 MPa, 5R= Leche HAP con 5 pases de 210 MPa

Caro *et al* (2014) describen a la textura del queso panela como húmeda (relacionada con el atributo blando), desmoronable y cremosa. Comparando estos atributos con los arriba descritos, la textura de los quesos HAP fue marcadamente diferente a la de los quesos HTST. Un incremento en las características de firmeza y arenosidad de quesos frescos sin adición de cultivo elaborados con leche HAP (300 MPa, $T_i=30^{\circ}\text{C}$) al compararlos con quesos elaborados con leche HTST fue previamente descrito por Zamora *et al.* (2011). Los resultados obtenidos concuerdan con las mediciones de textura instrumental, donde los quesos HAP al día 1 fueron ligeramente más firmes y menos cohesivos que los quesos HTST. Resulta evidente que es necesario buscar alternativas de procesos HAP que permitan mejorar las características texturales de quesos desde el punto de vista sensorial. Bajo las condiciones de proceso implementadas, las características obtenidas se semejan a las de un queso *blanco* elaborado con leche tratada por HAP, de manera similar a lo reportado por Escobar *et al* (2011).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones obtenidas de esta tesis son las siguientes:

- a) Se lograron establecer condiciones de procesamiento de leche entera por HAP que resultaron equivalentes desde el punto de vista microbiológico a una pasteurización térmica a alta temperatura y corto tiempo (HTST). Debido a que la P máxima de operación del homogeneizador fue menor a 300 MPa (la P requerida para pasteurizar leche por HAP de acuerdo a reportes previos), estas condiciones se definieron con PM a P más bajas (202 MPa, 5 pases; 232 MPa, 4 pases). Por practicidad, las P de operación se redondearon a 210 y 250 MPa, respectivamente. Los parámetros de proceso definidos fueron suficientes para lograr la reducción de cinco ciclos logarítmicos tanto del patógeno de leche identificado como el más barorresistente (*S. aureus*) como de un grupo indicador (BMA's).
- b) Los procesos de PM de HAP generan cambios notables en las propiedades fisicoquímicas específicas de leche entera con relación a leche HTST, los cuales mejoraron los valores de variables empleados como predictores de la habilidad de leche para elaborar queso fresco, incluyendo incremento en la capacidad de retención de agua, aumento en la firmeza de gel y reducción en el tiempo de coagulación. Estas modificaciones estuvieron asociadas a cambios estructurales en tamaño de glóbulo graso, superficie específica y grado de desnaturalización proteica. Por otra parte, el tratamiento a PM de HAP a 210 MPa de leche presentó una disminución de pH marcadamente diferente al del control y del tratamiento a PM de HAP a 250 MPa, lo cual pudo afectar el desarrollo de características funcionales y sensoriales del queso elaborado.
- c) Desde el punto de vista composicional, los procesos HAP seleccionados constituyeron una alternativa válida para la elaboración de quesos panela, dado que permitían incrementar significativamente el rendimiento quesero

Conclusiones y recomendaciones

mientras cumplieran con los requisitos indicados en la Norma Mexicana correspondiente. Desde el punto de vista fisicoquímico, los principales cambios detectados fueron en reducciones significativas en parámetros selectos de textura, principalmente dureza y cohesividad instrumental al día 1 y durante el almacenamiento refrigerado; además, estos cambios estructurales se reflejaron en características no apropiadas de calidad como un incremento sustancial en la sinéresis durante el almacenamiento refrigerado.

- d) Se observaron modificaciones significativas en características sensoriales de leche tratada por PM de HAP en comparación con leche HTST, así como cambios sustanciales en quesos panela elaborados con estas materias primas. Los tratamientos de HAP inocuos desde el punto de vista microbiológico produjeron leche y queso que no fue semejante a los productos HTST.

Asimismo, se realizan las siguientes recomendaciones para abordarse en investigaciones futuras.

- a) Debido a la dificultad inherente a la aplicación de pases múltiples, se sugiere evaluar un posible incremento de la temperatura de entrada de leche al homogeneizador para intentar disminuir el número de pases aplicados y con ello el desgaste del equipo. Posteriormente, se tendrían que reevaluar posibles cambios en la capacidad de la leche para elaborar queso panela.
- b) Se estima necesario ampliar la investigación concerniente a la modificación de proteínas lácteas al someterse la leche a PM de HAP, en particular sobre la magnitud de la desnaturalización de proteínas séricas; para ello, resulta necesario llevar a cabo pruebas estándar mediante cromatografía de líquidos de alto desempeño.
- c) Considerando que el empleo de una tecnología mixta (HTST + 1 pase de HAP) fue la que produjo mejores resultados en términos de rendimiento, sinéresis y características de texturales del queso panela, se recomienda llevar a cabo un estudio exhaustivo sobre la viabilidad de emplear una pasteurización térmica asistida con homogeneización a alta presión. Por otra parte, es relevante realizar estudios paralelos con otras variedades de queso

Conclusiones y recomendaciones

con características texturales diferentes (p.e. queso cottage, queso crema) donde los posibles defectos de textura asociados con el uso de PM de HAP (p.e. disminución en dureza) no sean objetables.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abeni, F., Degano, L., Calza, F., Giangiacomo, R., Pirlo, G. 2005. Milk quality and automatic milking: Fat globule size, natural creaming and lypolysis. *J.Dairy Sci.* 3519-3529

Álvarez, V.B. 2009. Fluid milk and cream products. *En The sensory evaluation of dairy products*. 2nd Ed. S. Clark, M. Costello, M. A. Drake, F. Bodyfelt (ed). Springer, New York, NY.

Amador-Espejo, G.G., Suárez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M.E., Trujillo, A.J. 2014. Effect of moderate inlet temperatures in ultrahigh pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *J Dairy Sci.* 97(2): 659-671

Anema, S.G. 2012. Pressure-induced denaturation of b- lactoglobulin in skim milk: effect of milk concentration. *J. Ag. Food Chem.* 60:6565-6570

Anema, S.G. 2009. The Whey Proteins in Milk: Thermal Denaturation, Physical Interactions and Effects on the Functional Properties of Milk. *En Milk Proteins: From Expression to Food*. A. Thompson, M. Boland, H. Singh (ed). Academic Press, New York, NY.

Anema, S. 2008. Effects of milk solids concentration on whey denaturation, particle size changes and solubilization of casein in high-pressure-treated skim milk. *Int. Dairy. J.* 18:228-235

Anema, S. G., Lowe, E. K., Stockmann, R. 2005. Particle size changes and casein solubilisation in high-pressure-treated skim milk. *Food Hydrocolloid*, 19, 257–267.

Anema, S.G. and McKenna, A.B. 1996. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *J.Agric. Food Chem.*44:422-428

Arias, M., Lopez-Fandino, R., Olano, A. 2000. Influence of pH on the effects of high pressure on milk proteins. *Milchwissenschaft*, 55, 191–194.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition. AOAC International. Gaithersburg, MD.

Augustin, M.A., Udabage, P. 2007. Influence of processing on milk and dairy proteins. *En: Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. 53. S.L. Taylor (ed). Academic Press. Oxford, UK.

Auty, M. 2011. Microscopy (Microstructure of milk constituents and products). *En: Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd Ed. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed). Academic Press. Oxford, UK.

Avure Technologies. High Pressure Processing of Food. Food Applications. 2012. Obtenido Junio 24, 2012 del sitio Web de Avure Technologies Inc.: <http://www.avure.com/food/applications/>

Bibliografía

- Azti Tecnalia. Unidad de Investigación Alimentaria. Tecnología de Altas presiones. Obtenido Diciembre 15, 2011 del Portal de Información de Tecnología y Mercados para el Sector Alimentario. <http://www.alimentatec.com/>
- Bhandari, V., Singh, H. 2011. Physical Methods. *En: Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd Ed. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed). Academic Press. Oxford, UK.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Bermúdez-Aguirre, D. 2010. Pasteurization of milk with pulsed electric fields. *En: Improving the safety and quality of milk*. Vol. 1: Milk production and processing. M.W. Griffiths (ed) CRC/ Woodhead Publishing Inc. Cambridge, UK.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Q. H. Zhang, M. D. Pierson, D. W. Schaffner. 2000. High voltage arc discharge. *J. Food Sci. Suppl.* 65(4):80-81.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. 2005. Novel food processing technologies. CRC Press. Boca Ratón, FL. USA.
- Baş D., Boyacı, I.H. 2007. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78:836-845
- Belloch, C., Gurrea, M.C., Tárreaga, A., Sampedro, F., Carbonell, J.V. 2012. Inactivation of microorganisms in orange juice by high pressure homogenization combined with its inherent heating effect. *Eur. Food Res Technol.* 234:753-760
- Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V. 2010. Processing of soft hispanic cheese ("Queso Fresco") using thermo-sonicated milk: a study of physicochemical characteristics and storage life. *J. Food Sci.* 75(9): S548- S558
- Berton, A., Rouvellac, S., Robert, B., Rousseau, F., Lopez, C., Crenon, I. 2012. Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their *in vitro* digestion by the human pancreatic lipase: Native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloid.* 29: 123-134.
- Bilbao-Sáinz, C., Younce, F.L. Rasco, B., Clark, S. 2009. Protease stability in bovine milk under combined thermal-high hydrostatic pressure treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10(3): 314-320
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C. Legrand, J. 2006. Functional Properties Of Whey Proteins As Affected By Dynamic High-Pressure Treatment. *J. Dairy Sci* 16:275–284.
- Bourne, M. 2002. Food texture and viscosity: Concept and measurement. 2^a Ed. Academic Press, NY, EUA.
- Bozoglu, F., Alpas., H. and Kaletunç, G. 2004. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 40(3):243-247
- Briñez, W.J. Roig-Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M.M., Guamis-López, B. 2006. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. *J. Food Protect.* 69(1): 86-92
- Briñez, W.J., Roig-Sagués, A.X., Hernández Herrero, M.M., Guamis López, B. 2007. Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice

Bibliografía

- using ultrahigh pressure homogenization and inlet temperatures of 6 and 20°C. *Food Control*. 18: 1282-1288
- Buffa, M. 2003. Aplicación de las altas presiones hidrostáticas en la elaboración de queso de cabra. *Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma De Barcelona*.
- Buffa, M., Guamis, B., Royo, C., Trujillo, A.J. 2001a. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized, and high pressure treated milk. *Food Microb*. 18:45-51
- Buffa, M., Trujillo, A., Pavia, M. Guamis B. 2001b. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *J. Dairy Sci* 11: 927–934.
- Bury, D., Jelen, P., Kalán, M. 2001. Disruption of *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: A comparison of sonication, high-Pressure homogenization and bead milling. *Innov. Food Sci Emerg. Tech*. 2:23-29.
- Bylund, G. 2003. Dairy Processing Handbook. 2nd Ed. TetraPack Processing Systems AB. Lund, Suecia.
- Calderón- Miranda, M.L. Barbosa-Cánovas, G.V. Swanson, B. G. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int J Food Microbiol*. 51(1): 19-30
- Calligaris, S., Foschia, M., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., Manzocco, L. 2012. Study of the applicability of high-pressure homogenization for the production of banana juices. *LWT*. 45:117-121
- Campos, F.P., Cristianini, M. 2007. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high pressure homogenisation. *Innov. Food Sci Emerg Technol*. 8: 226-229.
- Cano-Ruiz, M.E, Richter, R.L. 1997. Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. *J. Dairy. Sci*. 80:2732:2739
- Caro, I., Soto, S., Fuentes, L., Gutiérrez-Méndez, N., García-Islas, B., Monroy-Gayosso, K.E., Mateo, J. 2014. Compositional, functional and sensory characteristics of selected Mexican cheeses. *Food Nutrition Sci*. 5:366-375
- Cebrián, G., Michiels, C.W., Mañas, P., Condón, S. 2010. Biological approach to modeling of *Staphylococcus aureus* high-hydrostatic-pressure inactivation kinetics. *Appl. Environ. Microbiol*. 76(21): 6982-6990
- Cerdán-Calero, M., Izquierdo, L., Sentandreu, E. Valencia Late orange juice preserved by pulp reduction and high pressure homogenization: Sensory quality and gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatiles. *LWT* (2012). DOI: 10.1016/j.lwt.2012.11.016
- Cerf, O., Condrón, R. 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol Infect*.134(5): 946-951
- Chapman, K.W., Lawless, H.T., Boor, K.J. 2001. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. *J.Dairy Sci*. 84:12-20

Bibliografía

- Chawla, R., Patil, G.R., Singh, A.K. 2011. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *J Food Sci Technol.* 48(3): 260-268
- Chen, A.H., Larkin, J.W., Clark, C.J., Irwin, W.E. 1979. Textural analysis of cheese. *J Dairy Sci.* 62:901-907.
- Chen, H., Guan, D., Hoover, D.G. 2006. Sensitivity of foodborne pathogens to pressure changes. *J Food Protect.* 69(1):130-136
- Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Modelling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innov. Food. Sci. Emerg. Tech.* 4(1): 25-34
- Chevalier-Lucía, D., Cortés-Muñoz, M., Picart.Palmade, L., Dumay, E. 2011. Submicron emulsions processed by high pressure homogenization. *High Pressure Res.* 29(4) 732-738
- Chouliara, E., Georgogianni, K.G., Kanellopoulou, N., Kontominas, M.G. 2010. Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 20:307- 313
- Clark, J.P. 2007. High pressure effects on foods. *Food Tech.* 61(5):69-71
- Clark, S., Warner, H., Luedecke, L. 2001. Acceptability of queso fresco cheese by traditional and nontraditional consumers. *Food Sci. Tech. Int.* 7(2): 165-170
- Considine, K.M. Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Sleator, R.D. 2008. High pressure processing: effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiol. Lett.*281(1):1-9
- Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., Ciccarone, C., Sinigaglia, M. 2010. Ultra high pressure homogenization as a mean to control the growth of foodborne moulds in tomato juice. *Food Control.* 21(11): 1507-1511
- Datta, N., Hayes, M.G., Deeth, H., Kelly, A.L. 2005. Significance Of Frictional Heating For Effects Of High Pressure Homogenisation On Milk. *Journal of Dairy Research.* 72:1–7.
- De Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., Petukhov, A.V. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.*171-172: 36-52
- De Lamo-Castellvi, S. 2006. Behaviour of Pathogenic Gram Negative Bateria Inoculada in Milk and Model Cheese Treated With Hydrostatic Pressure. *Tesis de doctorado.* Universidad Autónoma de Barcelona
- De Lamo-Castellví, S., Roig-Sagués, A.X., Capellas, M., Hernandez-Herrero, M., Guamis, B. 2005. Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microb.* 102(3): 337-342
- Deeth, H.C., Datta, N. 2011a. Non-thermal technologies; Introduction. *En: Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2nd Ed. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed). Academic Press. Oxford, UK.
- Deeth, H.C., Datta, N. 2011b. Pulsed Electric Field Technology and Ultrasonication. *En: Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2nd Ed. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed). Academic Press. Oxford, UK.

Bibliografía

- Desobry-Banon, S., Richard, F., Hardy, J. 1994. Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *J. Dairy Sci.* 77: 3267-3274
- Devi, A.F., Buckow, R., Hemanr, Y., Kasapis, S. 2013. Structuring dairy systems through high pressure processing. *J Food Eng.* 114: 106-122
- Diels, A., Callewaert, L., Wuytack, E., Masschalck, B. Michiels, C.W. 2005. Inactivation Of Escherichia Coli By High-Pressure Homogenisation Is Influenced By Fluid Viscosity But Not By Water Activity And Product Composition. *Int. J Food Microb.* 101:281– 291.
- Diels, A., Wuytack, E., Michiels, C.W. 2003. Modelling Inactivation of Staphylococcus Aureus And Yersinia Enterocolitica By High-Pressure Homogenisation At Different Temperatures. *Int. J. Food Microb.* 87:55– 62.
- Diels, A.M.J., Callewaert, L., Wuytack, E.Y., Masschalck, B., Michiels, C.W., 2004. Moderate temperatures affect Escherichia coli inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnol. Prog.* 20, 1512– 1517.
- Diels, J., Michiels, C.W. 2006. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Crit Rev Microbiol.* 32:201–216.
- Dogan, C., Erkmen, O. 2003. Note: Ultra high hydrostatic pressure inactivation of Escherichia Coli in milk, and orange and peach juices. *Food Sc. Tech. Int.* 9(6):403-407
- Dogan, C., Erkmen, O. 2004. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, peach and orange juices. *J. Food Eng.* 62:47-52
- Donaghy, J.A., Linton, M., Patterson, M.F., Rowe, M.T. 2007. Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 45(2): 154-159.
- Donsi, F., Annunziata, M., Ferrari, G. 2013. Microbial inactivation by high pressure homogenization: Effect of disruption valve geometry. *J. Food Eng.* 115:362-370
- Donsi, F., Ferrari, G., Lenza, E., Maresca, P. 2009. Main factors regulating microbial inactivation by high pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation. *Chem Eng Sci.* 64(3):520-532
- Donsi, F., Ferrari, G., Maresca, P. 2007. Pulsed high pressure treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of processing parameters. *J. Food Eng.* 78: 984-990.
- Drake, M., Harrison, S.L., Asplund, M., Barbosa-Cánovas, G., Swanson, B.G. 1997. High Pressure Treatment of Milk And Effects On Microbiological And Sensory Quality Of Cheddar Cheese. *J. Food Sci.* 62: 4.844-847.
- Dumay, E., Chevalier-Lucía, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Grácia-Juliá, A., Blayo, C. 2013. Technological aspects and potential applications of (ultra) high pressure homogenization. *Trends Food Sci. Technol.* 31:13-26
- Dupont, D., Grogennec, T., Brodkorb, A., Kouaouci, R. 2013. Quantitation of Proteins in Milk and Milk Products. *En: Advances in Dairy Chemistry. Vol. 1A. Proteins: Basic Aspects.* P.L.H. McSweeney, P.F. Fox (Ed.). Springer. New York, EUA.

Bibliografía

- Emmons, D.B., Ernstrom, C.A., Lacroix, C., Verret, P. 1991. Yield Formulae. *En: Factors affecting the yield of cheese*. IDF Special Issue No. 9301. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica. J. Sci. Food Agric. 92- 1245- 1252
- Engin, B., Karagul Yuceer, Y. 2012. Effects of ultraviolet light and ultrasound on microbial quality and aroma-active compounds of milk.
- Erkmen, O., Karataş, S. 1997. Effect of high hydrostatic pressure on *Staphylococcus aureus* in milk. *J Food Eng.* 33(3): 257-262
- Escobar, D., Clark, S., Ganesan, V., Repiso, L., Waller, J., Harte, F. 2011. High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition and texture of queso fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 94(3) 1201-1210
- Feijoo, S.C., Hayes, W.W., Watson, C.E., Martin, J.H. 1997. Effects of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* in ice cream mix. *J. Dairy Sci.* 80:2184-2187
- Fellows, P. 2000. Food processing technology. Principles and practice. 2nd Edition. CRC/ Woodhead Publishing Ltd. Boca Raton, FL.
- Fernández-Molina, J.J., Barbosa-Cánovas, G.V, Swanson, B.G. 2005. Skim milk processing by combining pulsed electric fields and thermal treatments. *J. Food Process. Pres.* 29(5-6): 291-306
- Fluory, J., Bellestre, J., Legrand, J., Desrumaux, A. 2004. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part A. Study of the flow pattern. *Chemical Eng. Sci.* 59(4):843-853 Citado en: Briñez-Zambrano, W.J. 2006. Estudio de la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de microorganismos en alimentos líquidos. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección de los equipos. pp. 58-59 *Tesis doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Fluory, J., Desrumaux, A., Lardières, J. 2000. Effect of high pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 1(3):127-134
- Fluory, J., Grosset, N., Leconte, N., Pasco, M., Madec, M., Jeantet., R. 2006. Continuous raw skim milk processing by pulse electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Lait* 86:43-57
- Food and Drug Administration. 2011. Grade A Pasteurized Milk Ordinance 2011 Revision. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Food and Drug Administration. Washington, D.C.
- Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. 2004. Cheese: An overview. *En Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1: General Aspects. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee (ed). 3a edición. Elsevier Academic Press. Oxford, UK.
- Fox, P.F. y P.L.H. Mc. Sweeney. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional. London, U.K.
- Freeman, M. 2007. Comunicación personal. *Stansted Fluid Power Ltd.*
- Gallerani, G., Gasperi, F., Monetti, A. 2000. Judge selection for hard and semi-hard cheese sensory evaluation. *Food Qual Prefer.* 11:465-474

Bibliografía

- Gallier, S., Gragson, D., Jiménez-Flores, R., Everett, D. 2010. Using confocal laser scanning microscopy to probe the milk fat globule membrane and associated proteins. *J Ag. Food Chem.* 58:4250-4257
- García-Amézquita, L.E., Primo-Mora, A.R., Barbosa-Cánovas, G.V., Sepúlveda, D.R. 2009. Effect of nonthermal technologies on the native size distribution of fat globules in bovine cheese-making milk. *Innov Food Sci Emerg Technol* 10(4): 491-494
- García-Graells, C. Valckx C., Michiels, C. 2000. Inactivation of *Escherichia Coli* and *Listeria Innocua* in Milk By Combined Treatment With High Hydrostatic Pressure and the Lactoperoxidase System. *Applied and Environmental Microbiology.* 66:10. 4173–4179.
- García-Risco, M. R., Recio, I., Molina, E., López-Fandiño, R. 2003. Plasmin activity in pressurized milk. *Journal of Dairy Science*, 86,728–734.
- García-Risco, Olano, A., Ramos, R., López-Fandiño, R. 2000. Micelar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk. *J. Dairy Sci.* 83(10), 2184-2189.
- Gaucheron, F., Famelart, M.H., Mariette, F., Raulot, K., Michel, F., Le Graet, Y. 1997. Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chem.* 59(3):439-447
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P. 2002. Methods For Disruption Of Microbial Cells For Potential Use In The Dairy Industry- A Review. *J. Dairy Sci* 12:541–553.
- Gervilla, R., Ferragut, V., Guamis, B. 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk with different fat contents. *J.Dairy Sci.* 83:674-682
- Gervilla, R., Ferragut, V., and Guamis, B. 2001. High hydrostatic pressure effects on color and milk-fat globule of ewe's milk. *J. Food Sci.* 66(6):880-885.
- Gervilla-Fernández, R. 2001. Estudio de Los Tratamientos Por Altas Presiones Hidrostáticas En La Leche De Oveja. *Tesis de doctorado.* Universidad Autónoma de Barcelona.
- Goff, D. 2013. Dairy Science and Technology website. University of Guelph. www.foodsci.uoguelph.ca. Verificado en: 12/12/2013
- Goff, D. and Hill, R.A. 1993. Chemistry and Physics. *In Dairy Science and Technology Handbook.* Vol I. Principles and Properties. Y.H. Hui (ed). Wiley-VCH Inc. New York, NY. pp. 1-81
- Goff, H.D. and Griffiths, M.W. 2006. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *J. Dairy Sci.* 89:1163-1173
- Gould, G.W. 2000. New and emerging physical methods of preservation. *In "The Microbiological Safety and Quality of Food."* Vol. I. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, and G.W. Gould (ed). p. 277-293. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Md.
- Grácia-Juliá, A., René, M., Cortés-Muñoz, M., Picart, L., López-Pedemonte, T., Chevalier, D. and Dumay, E. 2008. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: A comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. *Food Hydrocolloids.* 22:1014-1032.

Bibliografía

- Grappin R. and Beuvier E. 1997. Possible Implications Of Milk Pasteurization On The Manufacture And Sensory Quality Of Ripened Cheese. *Int. Dairy Journal* 7: 751-761.
- Guerra-Martínez, J.A., Montejano, J.G., Martín del Campo, S.T. 2012. Evaluation of proteolytic and physicochemical changes during storage of fresh Panela cheese from Queretaro, Mexico and its impact in texture. *CYTA J Food*. 10(4):296-305
- Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V. y Swanson, B.G. 2005. High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. *Food Reviews International*. 21: 411- 425
- Guerzoni, M.E., Vannini, L., Chaves-Lopez, C., Lanciotti, R., Suzzi, G., Gianotti, A. 1999. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. *J Dairy Sci*. 82(5): 851-862
- Guinee, T.P. 2007. What effects has homogenization of milk on the manufacture and quality of cheese? *En: Cheese Problems Solved*. P.L.H. McSweeney (ed). CRC Press/ Woodhead Publishing Co. Cambridge. England.
- Harte, F., Luedecke, L., Swanson, B., and Barbosa-Canovas, G.V. 2003. Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. *J. Dairy Sci*. 86: 1074-1082
- Harte, F. 2012. High Pressure Homogenization. Food Proteins/ Engineering Lab. Food Biopolymers Group. The University of Tennessee. web.utk.edu/~fede/index.html. Verificado: 4/10/2012.
- Hayes, M. and Kelly, A.L. 2003a. High Pressure Homogenisation Of Raw Whole Bovine Milk (A) Effects On Fat Globule Size And Other Properties. *Journal of Dairy Research* 70: 297–305.
- Hayes, M. and Kelly, A.L. 2003b. High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *J. Dairy Res*. 70:307–313.
- Hayes, M., Fox, P.F. and Kelly, A.L. 2005. Potential Applications Of High Pressure Homogenisation In Processing Of Liquid Milk. *J. Dairy Res*. 72:25–33.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., and Weemaes, C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci. Tech*. 9(5) 197-203
- Hernández-Tinoco, A., Ramos-Ramírez, E.G., Falcony-Guajardo, C. Salazar-Montoya, J.A. 2004. Rheometry and scanning electron microscopy study of casein curds added with mesquite seed gum and soy proteins. *Lat Am Appl Res*. 34(3): 195-202.
- Hite, B.H. 1899. The effect of pressure in the preservation of Milk. *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin*. 1899, 58, 15-35.
- Hite, B.H. 1914. The effect of pressure on certain micro-organisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin*. 1899, 146, 126-150.
- Hnosko, J., Clark, S., Van Hekken, D. 2009. Latin American cheeses. *En The sensory evaluation of dairy products*. 2nd Ed. S. Clark, M. Costello, M. A. Drake, F. Bodyfelt (ed). Springer, New York, NY.

Bibliografia

- Hofstetter, S., Gebhardt, D., Ho, L., Gänzle, M., McMullen, L.M. 2013. Effects of nisin and reutericyclin on resistance of endospores of *Clostridium* spp. to heat and high pressure. *Food Microbiol.* 34(1):46-51
- Hooi, R., Barbano, R.G., Bradley Jr, R.L., Budde, D., Bulthaus, M., Chettiar, M., Lynch, J. Reddy, R. 2004. Chemical and Physical Methods *En Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 17th Ed. H.M. Wehr, J.F. Frank (ed). American Public Health Association. Washington, D.C.
- Huppertz, T., de Kruif C.G. 2007. High pressure induced solubilisation of micellar calcium phosphate from cross-linked casein micelles. 2007. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 295: 264-268
- Huppertz, T., de Kruif, C.G. 2006. Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure: influence of milk serum composition and casein micelle concentration. *J. Ag. Food Chem.* 54: 5903-5909.
- Huppertz, T., Kelly A. L., Fox P. F. 2002. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *Int. Dairy J.* 12(7): 561-572.
- Huppertz, T., Fox, P. and Kelly, A.L. 2003. High pressure-induced changes in the creaming properties of bovine milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 4: 349–359.
- Huppertz, T., Fox, P.F. and Kelly, A.L. 2004a. Plasmin activity and proteolysis in high-pressure treated bovine milk. *Lait* 84: 297-304
- Huppertz, T., Fox P.F., and Kelly A.L. 2004b. High-pressure induced dissociation of caseins from micelles. *Int Dairy J.* 14 575–580.
- Huppertz, T. Fox P. Kelly A.L. 2004c. High Pressure Treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *J. Dairy Res.* 71: 97-106
- Huppertz, T. Fox P. Kelly A.L. 2004d. High Pressure-induced denaturation of α -lactalbumin and b-lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *J. Dairy Res.* 71: 489-495
- Huppertz, T., Fox, P.F., and Kelly, A.L. 2004e. Effect of high pressure treatment on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 5(1): 1-8
- Huppertz T., Hinz, K., Zobrist, M.R., Uniacke, T., Kelly A.L. Fox P.F. 2005. Effects of high pressure treatment on the rennet coagulation and cheese-making properties of heated milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 6: 279-285
- Huppertz, T., Kelly, A.L. 2006. Physical chemistry of milk fat globules. *En Advanced Dairy Chemistry Vol. 2. Lipids* 3rd Ed. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed). Ed. Springer. USA.
- Huppertz, T., Smiddy, M.A., Upadhyay, V.K., Kelly, A. 2006. High pressure-induced changes in bovine milk: a review. *Int. J. Dairy Tech.* 59(2): 58-66
- Huppertz, T., Vaia, B., and Smiddy, M.A. 2008. Reformation of casein particles from alkaline disrupted casein micelles. *J. Dairy Res.* 75:44-47
- Hussain, R., Gaiani, C., Jeandel, C., Ghanbaj, J., Scher, J. 2012. Combined Effect of Heat Treatments and Ionic Strenght on the Functionality of Whey Proteins. *J. Dairy Sci.* 95(11):6260-6273

- Institute of Food Technologists. 2002. IFT expert report on emerging microbiological food safety issues: Implications for control in the 21st Century. www.ift.org Verificado en: 15/07/2008.
- Jang, H.D., Swaisgood, H.E. 2000. Difulsid bond formation between thermally denatured β -Lactoglobulin and κ -Casein in Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* 73(4):900-904.
- Jellema, R.H., Janssen, A.M., Tersptra, M.E.J., de Wijk, R.A., Smilde, A.K. 2005. Relating the sensory sensation “creamy mouthfeel” in custards to rheological measurements. *J. Chemometr.* 19:191-200
- Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A.E., Garcí-Garibay, M. 2009. Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. *LWT.* 42:1508-1512
- Johnson, M.E. and Lucey, J.A. 2006. Major technological advances and trends in cheese. *J.Dairy. Sci.* 89:1174-1178
- Johnson, M.E. 2001. Cheese products. *En Applied Dairy Microbiology* 2nd Ed. E.H. Marth, J.L. Steele (ed). Marcel Dekker, New York, NY.
- Johnston, D.E. 1995. High pressure effect on milk and meat. *En High Pressure Processing of Foods.* D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw and A.P.M. Hastings (eds). Nottingham University Press. Nottingham, U.K. pp. 99-121
- Jung, S., Tonello-Sampson, C., de Lamballerie. 2011. High hydrostatic pressure food processing. *En: RSC Green Chemistry No. 1. Alternatives to Conventional Food Processing.* A. Proctor (ed). Royal Society of Chemistry. pp. 254-306
- Kelemen, M.V. and Sharpe, J.E.E. 1979. Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different microorganisms. *J. Cell. Sci.* 35: 431-441.
- Kelly, A.L., Datta, N. and Deeth, H. C. (2005). Thermal processing of dairy products. *En Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues* D.W. Sun (ed.). (pp. 265-298) Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- Kim, H., Hardy, J., Novak, G., Ramet, J.P., Weber, F. 1984. Off-tastes in raw and reconstituted milk. *FAO Animal Production and Health Paper* 35. FAO, Roma.
- Kheadr, E., Vachon, J.F., Paquin, P. and Fliss, I. 2002. Effect Of Dynamic High Pressure On Microbiological, Rheological And Microstructural Quality Of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci* 12:435–446.
- Knudsen, J.C., Skibsted, L.H. 2010. High pressure effect on the structure of casein micelles in milk studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chem.* 119: 202-208
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J.M. 2007. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV- light treatment system. *J. Food Sci.* 72(7) M233-M299
- Lamb, A., Payne, F., Xiong, Y.L., Castillo, M. 2013. Optical Backscatter Method for Determining Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin and Other Whey Proteins in Milk. *J. Dairy Sci.* 96: 1356-1365

Bibliografía

- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Angelini, P., Guerzoni, M.E., 1994. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 319–322.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Lucci, L., Vallicelli, M. Ndagijimana M. Guerzoni M.E. 2006. Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. *J.Dairy Res.*73:216–226.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Pittia, P., Guerzoni, M.E. 2004. Suitability Of High-Dynamic-Pressure-Treated Milk For The Production Of Yogurt. *Food Microbiology* 2:753–760.
- Law, B.A., Tamime, A.Y. 2010. Technology of Cheesemaking. 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Sussex, UK.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J. 1987. Texture development during cheese ripening. *J Dairy Sci.* 70(8): 1748-1760
- Lazar, I. 2010. Gel Analyzer 2010a software. www.gelanalyzer.com/index.html. Verificado en: 1/08/2014
- Lee, J.S., Sherbon, J.W. 2002. Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *J. Dairy Res.* 69(4): 555-567
- Lewis, M.J. 1993. Propiedades Físicas de los Alimentos y de los Sistemas de Procesado. Ed. Acribia. Zaragoza, España
- Lobato-Calleros, C., Ramos-Solís, L., Santos-Moreno, A., Rodriguez-Huezo, M.E. 2006. Microstructure and texture of panela type cheese-like products: Use of low-methoxyl pectin and canola oil as milk-fat substitutes. *Rev. Mex. Ing Quim.*5(1):71-79
- López-Fandiño, R. and Olano, A. 1998. Effects of high pressure combined with moderate temperatures on the rennet coagulation properties of milk. *Int. Dairy J.* 8: 623-627
- López-Fandiño, R., Carrascosa, A.V.and Olano, A. 1996. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *J. Dairy Sci.* 79: 929-936.
- López-Fandiño, R., Ramos, M., and Olano, A. 1997. Rennet coagulation of milk subjected to high pressures. *J. Ag. Food Chem.* 45(8): 3233-3237
- López-Pedemonte, T., Briñez, W.J., Roig-Sagués, A.X., Guamis, B. 2006. Fate of *Staphylococcus aureus* in cheese treated by ultrahigh pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *J.Dairy Sci.*89 (12): 4536-4544
- Ludikhuyze, L., Claeys, W., & Hendrickx, M. E. 2000. Combined pressure-temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: A kinetic study. *J. Food Sci.* 65, 155–160.
- Ludikhuyze, L., Claeys, W., & Hendrickx, M. E. 2001. Effect of temperature and/or pressure on lactoperoxidase activity in bovine milk and acid whey. *J. Dairy Res.* 68(4): 625-37

Bibliografía

- Maresca, P., Donsi, F., Ferrari, G. 2011. Application of multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. *J Food Eng.* 104(3):364-372
- Martínez-Valencia, B. 2013. Análisis por espectroscopía de infrarrojo de la agregación de betalactoglobulina de leche bovina por efecto de diversos procesos de pasteurización. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. IPN. Tepetitla, Tlaxcala.
- Mettler-Toledo. 2006. Protein Analysis Increases Food Quality. *Flavors and Ingredients News.* 2:4 http://uk.mt.com/gb/en/home/supportive_content/magazines/Flavors_and_Fragrances_eNews_Laboratory/FlavorsIngredientsNews0602.html. Verificado en: 22/05/2014
- Michalski, M.C., Michel, F., Geneste, C. 2002. Appearance of submicronic particles in the milk fat globule size distribution upon mechanical treatments. *Lait* 82(2) 193-208
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J., Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *Int. Dairy J.* 12(11): 907-913.
- Mújica-Paz, H., Valdéz-Fragoso, A., Tonello-Samson, C., Welte-Chanes, J., Torres, J.A. 2011. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of food. *Food Bioprocess Technol.* 4: 969-985
- Muir, D.D. 1996. The shelf life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *J. Soc. Dairy Tech.* 49(1):24-32
- Mussa, D.M. and Ramaswamy, H.S. 1997. Ultra high pressure pasteurization of milk: Kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. *LWT.* 30(6):551-557
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for foods. 2006. Requisite Scientific Parameters For Establishing The Equivalence Of Alternative Methods Of Pasteurization. *J Food Protect.* 69(5) 1190–1216.
- NC Hiperbaric. Our customers. 2012. Obtenido Julio 24, 2012 del sitio Web de NC Hiperbaric High Pressure Processing: <http://www.hiperbaric.com/Pressure-Assisted-Thermal-Sterilization/>
- Needs, E. C., Stenning, R. A., Gill, A. L., Ferragut, V., & Rich, G. T. 2000. High-pressure treatment of milk: Effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *J. Dairy Research*, 67,31–42.
- Nicolau, N., Xu, Y., Goodacre, R. 2010. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *J. Dairy Sci.* 93(12): 5651-5660
- NMX. 2012. Norma Mexicana F742-Cofocalec. Sistema Producto Leche- Alimentos Lácteos- Queso Panela. Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Diario Oficial. 20 de Marzo de 2014. México, D.F.
- NOM. 1995a. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial. 12 de diciembre de 1995. México, D.F.

- NOM. 1995b. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial. 10 de mayo de 1995. México, D.F.
- Ogihara, H., Yatuzuka, M., Horie, N., Furukawa, S., Yamasaki, M. 2009. Synergistic effect of high hydrostatic pressure treatment and food additives on the inactivation of *Salmonella enteritidis*. *Food Control*. 20(11):963-966.
- Okpala, C.O.R., Piggot, J.R., Schaschke, C.J. 2010. Influence of high pressure processing (HPP) on physicochemical properties of fresh cheese. *Innov. Food Sci. Emerg Tech.* 11:61-67
- Olson, D.W., White, C.H., Richter, R.L. 2004. Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *J. Dairy Sci.*87:3217-3223
- Ono, T., Murayama, T., Kaketa, S., and Odagiri, S. 1990. Changes in the protein composition and size distribution of bovine casein micelles induced by cooling. *Ag. Biol. Chem.* 54(6): 1385-1392.
- On-Nom, N., Grandison, A.S., Lewis, M.J. 2010. Measurement of ionic calcium, pH and soluble divalent cations in milk at high temperature. *J. Dairy Sci.* 93: 515-523
- Orlien V., Knudsen J.C., Colon, M. and Skibsted, L.H. 2006. Dynamics of casein micelles in skim milk during and after high pressure treatment. *Food Chemistry*. 98:513–521.
- Pandey, P.K., Ramaswamy, H.S., St. Gelais, D. 2000. Water-holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. *Food Res Int.* 33:655-663
- Paquin, P. 1999. Technological Properties Of High Pressure Homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *J. Dairy Sci* 9:329-335.
- Pasztome-Huzsar, K. 2008. Protein Changes of Various Types of Milk as Affected by High Hydrostatic Pressure Processing. Tesis doctoral. Corvinus University of Budapest. Budapest, Hungría.
- Patrignani, F., Tabanelli, G., Siroli, L., Gardini, F., Lanciotti, R. 2013. Combined effects of high pressure homogenization treatment and citral on microbiological quality of apricot juice. *Int. J Food Microbiol.* 160(3): 273-281
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamden, S.L. S., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E. 2009. Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *Int. J Food Microbiol.* 136: 26-31
- Pathanibul, P., Taylor, T.M., Davidson, P.M., Harte, F. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin. *Int J Food Microbiol.* 129(2):316-320
- Pattel, H.A., Creamer, L.K. 2009. High pressure-induced interactions involving whey proteins. En: *Milk Proteins: from expression to food*. A. Thompson, M. Boland, H.Singh (ed.). (pp. 205-238) San Diego, CA: Academic Press.
- Patterson, 2005. M.F. Microbiology of pressure-treated food: A review. *J. Applied Microb.* 98:1400-1409

Bibliografía

- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. and Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J Food Protect* 58, 524–529.
- Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B. and Trujillo, A.J. 2006. Effect of Ultra-high Pressure Homogenization On Natural-occurring Micro-organisms In Bovine Milk. *Milchwissenschaft* 61(3): 245-248
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. and Trujillo, A.J. 2007. Effects Of Ultra-High Pressure Homogenization On Microbial and Physicochemical Shelf Life Of Milk. *J. Dairy Sci* 90:1081–1093
- Pereda, J., Jaramillo, D.P., Quevedo, J.M., Ferragut, V., Guamis, B. and Trujillo, A.J. 2008a. Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *Int. Dairy J.* 18: 826-834
- Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B. and Trujillo, A.J. 2008b. Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage. *Food Chem.* 111:696-702
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. and Trujillo, A.J. 2008c. Effect of ultra-high pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of Milk During Refrigerated Storage. *J.Ag. Food Chem.* 56: 7125-7130
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. and Trujillo, A.J. 2009. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloid.* 23(7): 1974-1979
- Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 2009. Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. *Trends Food Sci Tech.* 20:213-219
- Petit, J., Herbig, A.L., Moreau, G., Delaplace, G. 2011. Influence of calcium on b-lactoglobulin denaturation kinetics: Implications in unfolding and aggregation mechanisms. *J Dairy Sci.* 94(12): 5794-5810
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J.P., CefTel, J.C. and Dumay, E. 2006. Effects Of High Pressure Homogenisation Of Raw Bovine Milk On Alkaline Phosphatase And Microbial Inactivation. A Comparison With Continuous Short-Time Thermal Treatments. *J. Dairy Res.* 73:454–463.
- Pina-Pérez, M.C., Silva-Angulo, A.B., Rodrigo, D., Martínez-López, A. 2012. A preliminary exposure assessment model for *Bacillus cereus* cells in a milk based beverage: Evaluating High Pressure Processing and antimicrobial interventions. *Food Control.* 26(2): 610-613
- Pinho, C.R.G., Franchi, M.A., Tribst, A.A.L., Cristianini, M. 2011a. Effect of high pressure homogenization on *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores in skim milk. *Procedia Food Sci.* 1: 869-873
- Pinho, C.R.G., Franchi, M.A., Tribst, A.A.L., Cristianini, M. 2011b. Effect of high pressure homogenization on alkaline phosphatase and lactoperoxidase activity in skim milk. *Procedia Food Sci.* 1: 874-878
- Popper, L. and Knorr, D. 1990 Applications of high pressure homogenisation for food preservation. *Food Tech.* 44 (7) 84–89

Bibliografía

- Poliseli-Scopell, F.H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., Ferragut, V. 2012. Comparison of ultrahigh pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT*. 46(1): 42-48
- Rademacher B. and Hinrichs J. 2006. Effects of high-pressure treatment on indigenous enzymes in bovine milk: reaction kinetics, inactivation and potential application. *Int. Dairy J.* 16:655–661.
- Ramaswamy, H.S., Jin, H., Zhu, S. 2009. Effects of fat, casein and lactose on high-pressure destruction of *Escherichia coli* K12 (ATCC 29055) in milk. *Food Bioprod. Process.* 87:1-6
- Rastogi, N.K. 2010. Opportunities and Challenges in nonthermal processing of foods. *En. Innovations in Food Engineering*. M.L. Passos y C.P. Ribeiro (ed). CRC Press. Boca Raton, FL.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S, Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K., Knorr, D. 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 47:69-112.
- Raventos-Santamaria, M. 2005. *Industria Alimentaria: tecnologías emergentes*. Ediciones UPC. Cataluña, España.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J. Lyng, J.G. 2009. The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation. *Food Chem.* 114: 905-911
- Roach, A. and Harte, F. 2008. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelles isolates under high-pressure homogenization. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 9:1-8
- Rudolph, D. 2010. Extending shelf life of pasteurized milk (Webinar). *En Tetra Pak Webinars*. Obtenido de: <http://www.tetrapak.com/usprocessing/media/webinars>
- Saldo, J., Sendra, E., Guamis, B. 2002. Colour changes during ripening of high pressure treated hard caprine cheese. *High Pressure Res.* 22(3):659-663
- Samaranayake, Ch. P., Sastry, S.K. *In-situ* pH measurement of selected liquid foods under high pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* (2012) DOI: 10.1016/j.ifset.2012.09.006.
- San Martín-González, M. F., Rodríguez, J.J., Gurram, S., Clark S., Swanson B.G.; Barbosa-Cánovas G.V. 2007. Yield, Composition And Rheological Characteristics Of Cheddar Cheese Made With High Pressure Processed Milk. *LWT* 40(4):697–705.
- San Martín-González, M.F., Welti-Chanes, J. and Barbosa-Cánovas, G.V. 2006. Cheese manufacture assisted by high pressure. *Foods Review Int.* 22(3): 275-289
- Sandra, S. and Dalgleish, D.G. 2005. Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization and Heating on Structural Properties of Casein Micelles in Reconstituted Skim Milk Powder. *J. Dairy Sci* 15:1095–1104.
- Sandra, S. and Dalgleish, D.G. 2007. The effect of ultra high-pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. *Int. Dairy J.* 17: 1043-1052

Bibliografía

- Scollard, P.G., Beresford, T.P., Needs, E.C., Murphy, P.M., Kelly, A.L. 2000. Plasmin activity, β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. *Int Dairy J.* 10(12): 835-841
- Schrader, K., Buchheim, W. and Morr, C.V. 1997. High-pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. Part 1. High-pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Nahrung* 41 133–138.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. and Livney, Y.D. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloid.* 21(5-6):936-942
- Serra, M., Trujillo, A.J., Quevedo, J.M., Guamis, B. and Ferragut, V. 2007. Acid Coagulation Properties and Suitability for Yogurt Production Of Cows' Milk Treated By High-Pressure Homogenisation. *Int Dairy J* 17:782–790.
- Serra, M., Trujillo, A.J., Guamis, B. and Ferragut, V. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloid.* 23:82-91
- Sharma, S.K., Dalgleish, D.G. 1993. Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globule membrane during heating of homogenized whole milk. *J. Ag. Food Chem.* 41(9): 1407-1412
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., Ulrich, J. 2004. High pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem Eng Technol.* 27(4):361-368
- Singh, H., Waungana, A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *Int. Dairy J.* 11:543-551
- Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci Tech.* 9:152-158
- Smiddy, M., Martin, J., Huppertz, T. and Kelly A. 2007. Microbial Shelf-Life Of High-Pressure-Homogenised Milk. *Int. Dairy J.* 17:29–32.
- Smith, K., Mittal, G.S., Griffiths, M.W. 2002. Pasteurization of milk using pulsed electric fields and antimicrobials. *J. Food Sci.* 67(6): 2304-2308
- Smith, W. L., M. C. Lagunas-Solar, J. S. Cullor. 2002b. Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurization of bovine milk. *J. Food Prot.* 65:1480-1482.
- Styles, M.F., Hoover, D.G., Farkas, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* 56:1404-1407
- Subirade, M., Loupil, F., Allain, A.F., Paquin, P. 1998. Effect of Dynamic High Pressure on the Secondary Structure of β -Lactoglobulin and on Its Conformational Properties as Determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Int Dairy J.* 8:135-140
- Tahiri, I., Makhlof, J., Paquin, P. and Fliss, I. 2006. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. *Food Res Intl.* 39. 98–105.

Bibliografía

- Tewari, G., Javas, D.S., Holley, R.A. 1999. High pressure processing of foods: An overview. *Science des Aliments*. 19: 619-661
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P. and Cheftel, J.C. 2003. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* 13:427–439
- Thomann, S., Schenkel, P., Hinrichs, J. 2008. Effect of homogenization, microfiltration and pH on curd firmness and syneresis of curd grains. *LWT*. 41: 826-835
- Torres, J.A. and Velázquez, G. 2005. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of food. *J. Food Eng.* 67: 95-112
- Trujillo A.J., Capellas M., Saldo J. Gervilla R. Guamis B.2002.Applications Of High-Hydrostatic Pressure On Milk And Dairy Products: A Review. *Innov Food Sci Emerg Tech* 3:295–307.
- Trujillo, A., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., Sendra, E., Saldo, J., Ferragut, V., and Guamis, B. 2000. Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research. Int.* 33:311-316.
- Tunick, M., Hekken, D., Cooke, P.H., Smith, P.W., and Malin, E.L. 2000. Effect of High Pressure Microfluidization on Microstructure of Mozzarella Cheese. *LWT*. 33:538-544.
- Vachon, J.F. Kheadr, E.E., Giasson, J., Paquin, P., Fliss, I. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *J. Food Protect.* 65(2): 345-352
- Vannini, L., Patrignani, F., Iucci, L., Ndagijimana, M., Vallicelli, M., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E. 2008. Effect of pre-treatment of milk with high pressure homogenization on yield as well as on microbiological, lipolytic and proteolytic patterns of “Pecorino” cheese. *Int J Food Microbiol.* 128(2): 329-335
- Van Hekken, D., Tunick, M., Malin, E., and Holsinger, V. 2007. Rheology And Melt Characterization Of Low-Fat And Full Fat Mozzarella Cheese Made From Microfluidized Milk. *LWT* 40:89–98.
- Vázquez-Landaverde, P.A., Qian, M.C., Torres, J.A. 2007. Kinetic analysis of volatile formation in milk subjected to pressure-assisted thermal treatments. *J Food Sci.* 72(7): E389-E398
- Voigt, D.D., Chevalier, F., Donaghy, J.A., Patterson, M.F., Qian, M.C., Kelly, A.L. 2012. Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture and functionality of Cheddar cheese during ripening. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 13:23-30
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. 2006. Dairy Science and Technology. 2nd Edition. CRC. Boca Raton, FL.
- Welti-Chanes, J., San Martín-González, F., Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V. 2006. Water and Biological Structures at High Pressure. *En: Water Properties of Food, Pharmaceutical and Biological Materials.* Buera, M.P., Welti-

Bibliografía

- Chanes, J., Lillford, P.J. Corti, H.R. (ed). CRC Press/ Taylor and Francis. Boca Raton, FL.
- Werner, B.G., Hotchkiss, J.H. 2006. Continuous Flow Nonthermal CO₂ processing: The Lethal Effects of Subcritical and Supercritical CO₂ on Total Microbial Populations and Bacterial Spores in Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 89:872-881
- World Health Organization/ Food and Agriculture Organization (WHO/FAO). 2011. Codex Alimentarius. Milk and Milk Products. 2nd Ed. FAO/ WHO. Rome, Italy.
- Wuytack, E.Y., Diels, A.M.J., Michiels, C.W. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 77(3):205-212
- Yang, B., Shi, Y., Xia, X., Xi, M., Wang, X., Ji, B., Meng, J. 2012. Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control.* 28:273-278.
- Ye, A., Anema, S.G., Singh, H. 2004. High Pressure-Induced Interactions Between Fat Globule Membrane Proteins and Skim Milk Proteins in Whole Milk. *J. Dairy Sci.* 87: 4013-4022
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, Guamis, B., Trujillo, A.J. 2007. Effects Of Ultra-High Pressure On The Cheese-Making Properties Of Milk. *J. Dairy Sci.* 90:13–23.
- Zamora, A., Ferragut, V., Juan, B., Guamis, B., Trujillo, A.J. 2011. Effect Of Ultra-High Pressure Homogenization Of Milk On The Texture and Water-typology of a starter-free fresh cheese. *Innov Food Sci Emerg Tech* 12:484-490
- Zamora, A., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A.J. 2012a. Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenisation and conventional treatments of milk. *Food Hydrocolloid.* 29:135-143
- Zamora, A., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J. 2012b. Ultra-high pressure homogenisation of milk: technological aspects of cheese-making and microbial shelf life of a starter-free fresh cheese. *J Dairy Res.* 79:168-175
- Zamora, A., Trujillo, A.J., Armaforte, E., Waldron, D.S., Kelly, A.L. 2012c. Effect of fat content and homogenization under conventional or ultrahigh pressure conditions on interactions between proteins in rennet curds. *J.Dairy Sci.* 95: 4796-4803
- Zhang, S., Yang, R., Zhao, W., Hua, X., Zhang, W., Zhang, Z. 2010. Influence of pulsed electric field treatments on the volatile compounds of milk in comparison with pasteurized processing. *J. Food Sci.* 76(1): C127-C132
- Zhou, P. y Labuza, T.P. 2011. Differential Scanning Calorimetry. *En: Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2nd Ed. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed). Academic Press. Oxford, UK.
- Zobrist, M., Huppertz, T., Uniacke, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. 2005.High-Pressure-Induced Changes in The Rennet Coagulation Properties Of Bovine Milk. *J. Dairy Sci* 15:655–662.

7. APÉNDICES

Anexo 1

Pruebas de selección y entrenamiento de panel sensorial

Prueba 1 de selección: Prueba triangular

PRUEBA TRIANGULAR

Nombre: _____ Fecha: _____

Antes de empezar la prueba enjuaga tu boca con pan y agua. Frente a ti hay tres muestras, dos de ellas son iguales y una es **DIFERENTE**, degusta de izquierda a derecha y encierra en un círculo el número de la muestra que percibas **DIFERENTE**. No olvides enjuagar tu boca entre muestra y muestra.

910

233

809

¿Por qué es diferente?

¡Gracias!

Prueba 2 de selección: Prueba de asociación de aromas

Asociación de Aromas

Nombre: _____

Fecha: _____

Código	Nombre del descriptor	Asociación
951		
584		
466		
100		
840		
40		
622		
188		
161		
590		
958		
643		
932		
765		
217		

Prueba 3 de selección: Prueba de identificación de aromas

Identificación de aromas

NOMBRE: _____ **FECHA:** _____

INSTRUCCIONES: Recibirás 10 muestras de aromas conocidos, por favor ve tomando las muestras en el orden escrito abajo e **IDENTIFICA** el aroma, escribiendo el **NOMBRE DEL DESCRIPTOR** correspondiente. Entre cada muestra **NO OLVIDES OLER EL CAFÉ**. Evita mantener mucho tiempo la muestra en tu nariz para evitar confusión y/o saturación.

Muestra	Descriptor	Muestra	Descriptor
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

¡GRACIAS!

Prueba de entrenamiento: Prueba de perfil sensorial

Perfil sensorial de leche

Nombre: _____

Fecha: _____

	325	209
Sabor Global		
Aroma Global		

Anexo 2**Análisis estadísticos****Sección 4.1****A. Reducción microbiana a P y Ti variable****Modelo lineal general: Reducc log vs. Presión, Temp.**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presión	fijo	4	50, 150, 200, 250
Temp.	fijo	2	20, 40

Análisis de varianza para Reducc log, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presión	3	17.7623	16.2878	5.4293	31.01	0.000
Temp.	1	0.0490	0.0490	0.0490	0.28	0.610
Error	9	1.5759	1.5759	0.1751		
Total	13	19.3872				

S = 0.418450 R-cuad. = 91.87% R-cuad.(ajustado) = 88.26%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Temp.	N	Media	Agrupación
40	6	1.9	A
20	8	1.8	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presión	N	Media	Agrupación
250	4	3.5	A
200	4	2.1	B
150	4	1.4	B
50	2	0.2	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

B. Rendimiento queso con leche HAP a P y Ti variable**Modelo lineal general: Rendimiento vs. Presión, Temp**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presion R	fijo	4	50, 150, 200, 250
Temp R	fijo	2	20, 40

Análisis de varianza para Rendimiento, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presion R	3	15.281	13.910	4.637	3.03	0.086

Temp R	1	1.249	1.249	1.249	0.82	0.390
Error	9	13.789	13.789	1.532		
Total	13	30.318				

S = 1.23777 R-cuad. = 54.52% R-cuad.(ajustado) = 34.31%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Temp	N	Media	Agrupación
40	6	13.2	A
20	8	12.6	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion	N	Media	Agrupación
250	4	14.5	A
200	4	12.7	A
50	2	12.2	A
150	4	12.1	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

C. Incremento de rendimiento en quesos elaborados con leche HAP a P y Ti variable vs HTST

Modelo lineal general: Incremento de rendimiento vs. Presion R, Temp R

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presion R	fijo	4	50, 150, 200, 250
Temp R	fijo	2	20, 40

Análisis de varianza para Delta Rendimiento, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presion	3	11.7761	9.0131	3.0044	3.66	0.057
Temp	1	11.0444	11.0444	11.0444	13.47	0.005
Error	9	7.3805	7.3805	0.8201		
Total	13	30.2010				

S = 0.905567 R-cuad. = 75.56% R-cuad.(ajustado) = 64.70%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Temp R	N	Media	Agrupación
40	6	3.1	A
20	8	1.2	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion R	N	Media	Agrupación
250	4	3.4	A
50	2	1.9	A
150	4	1.7	A
200	4	1.6	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

D. Dureza de quesos HAP a P=250 MPa, con Ti y PM variables

Modelo lineal general: Dureza vs. Ti (°C), Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Ti (°C)	fijo	2	20, 40
Pases	fijo	2	1, 3

Análisis de varianza para Dureza, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Ti (°C)	1	0.69166	0.69166	0.69166	62.07	0.001
Pases	1	0.11198	0.11198	0.11198	10.05	0.034
Ti (°C)*Pases	1	0.05427	0.05427	0.05427	4.87	0.092
Error	4	0.04457	0.04457	0.01114		
Total	7	0.90249				

S = 0.105558 R-cuad. = 95.06% R-cuad.(ajustado) = 91.36%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Ti (°C)	N	Media	Agrupación
20	4	1.0	A
40	4	0.4	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
1	4	0.8	A
3	4	0.6	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Ti (°C)	Pases	N	Media	Agrupación
20	1	2	1.0	A
20	3	2	0.9	A
40	1	2	0.6	A B
40	3	2	0.2	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

E. Cohesividad de quesos HAP a P=250 MPa, con Ti y PM variables

Modelo lineal general: Cohesividad vs. Ti (°C), Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Ti (°C)	fijo	2	20, 40
Pases	fijo	2	1, 3

Análisis de varianza para Cohesividad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Ti (°C)	1	0.08047	0.08047	0.08047	1.19	0.336
Pases	1	0.01860	0.01860	0.01860	0.28	0.627
Ti (°C)*Pases	1	0.18805	0.18805	0.18805	2.79	0.170
Error	4	0.26995	0.26995	0.06749		
Total	7	0.55707				

S = 0.259783 R-cuad. = 51.54% R-cuad. (ajustado) = 15.20%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Ti (°C)	N	Media	Agrupación
40	4	0.7	A
20	4	0.5	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
3	4	0.6	A
1	4	0.5	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
3	4	0.6	A
1	4	0.5	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

F. Cohesividad de quesos HAP a P=250 MPa, con Ti y PM variables

Modelo lineal general: Elasticidad vs. Ti (°C), Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Ti (°C)	fijo	2	20, 40
Pases	fijo	2	1, 3

Análisis de varianza para Elasticidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Ti (°C)	1	0.09148	0.09148	0.09148	3.49	0.135
Pases	1	0.00839	0.00839	0.00839	0.32	0.602
Ti (°C)*Pases	1	0.09401	0.09401	0.09401	3.59	0.131
Error	4	0.10475	0.10475	0.02619		
Total	7	0.29863				

S = 0.161829 R-cuad. = 64.92% R-cuad.(ajustado) = 38.61%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Ti (°C)	N	Media	Agrupación
40	4	1.2	A
20	4	1.0	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
3	4	1.2	A
1	4	1.1	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Ti (°C)	Pases	N	Media	Agrupación
40	1	2	1.3	A
20	3	2	1.2	A
40	3	2	1.2	A
20	1	2	0.9	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Sección 4.2

G. Reducción microbiana de BMAs a P y N variable

Modelo lineal general: inactivación vs. presión, rec

Factor	Tipo	Niveles	Valores
presión	fijo	3	100, 175, 250
rec	fijo	3	1, 3, 5

Análisis de varianza para inactivación, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
presión	2	49.7792	49.7792	24.8896	85.30	0.000
rec	2	19.4872	19.4872	9.7436	33.39	0.000
presión*rec	4	1.8957	1.8957	0.4739	1.62	0.250
Error	9	2.6262	2.6262	0.2918		
Total	17	73.7882				

S = 0.540181 R-cuad. = 96.44% R-cuad.(ajustado) = 93.28%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

presión	N	Media	Agrupación
100	6	-0.9	A
175	6	-3.2	B
250	6	-4.9	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

rec	N	Media	Agrupación
1	6	-1.7	A
3	6	-3.1	B
5	6	-4.2	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

presión	rec	N	Media	Agrupación
100	1	2	-0.1	A
100	3	2	-1.0	A
100	5	2	-1.6	A B
175	1	2	-1.7	A B
250	1	2	-3.3	B C
175	3	2	-3.3	B C
175	5	2	-4.5	C D
250	3	2	-4.9	C D
250	5	2	-6.6	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

H. Reducción microbiana de *S.aureus* a P y N variable

Modelo lineal general: reduction vs. pressure, cycles

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pressure	fijo	3	100, 175, 250
cycles	fijo	3	1, 3, 5

Análisis de varianza para reduction, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
pressure	2	31.4715	31.4715	15.7358	524.39	0.000
cycles	2	19.9054	19.9054	9.9527	331.67	0.000
pressure*cycles	4	2.4161	2.4161	0.6040	20.13	0.000
Error	9	0.2701	0.2701	0.0300		
Total	17	54.0631				

S = 0.173228 R-cuad. = 99.50% R-cuad.(ajustado) = 99.06%

Observaciones inusuales de reduction

Obs	reduction	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
9	-3.93721	-4.18827	0.12249	0.25106	2.05 R
12	-4.43933	-4.18827	0.12249	-0.25106	-2.05 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

pressure	N	Media	Agrupación
100	6	-1.4	A
175	6	-2.6	B
250	6	-4.6	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

cycles	N	Media	Agrupación
1	6	-1.6	A
3	6	-2.8	B
5	6	-4.2	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

pressure	cycles	N	Media	Agrupación
100	1	2	-0.6	A
100	3	2	-1.3	A B
175	1	2	-1.4	B
175	3	2	-2.2	C
100	5	2	-2.2	C
250	1	2	-2.8	C
175	5	2	-4.2	D
250	3	2	-4.9	E
250	5	2	-6.1	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

I. Reducción microbiana de coliformes a P y N variable

Modelo lineal general: Reducción vs. P, Rec

Factor	Tipo	Niveles	Valores
P	fijo	3	100, 175, 250
Rec	fijo	3	1, 3, 5

Análisis de varianza para Reducción, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
P	2	45.5057	45.5057	22.7528	38.79	0.000
Rec	2	14.0623	14.0623	7.0312	11.99	0.000
P*Rec	4	2.9045	2.9045	0.7261	1.24	0.318
Error	27	15.8363	15.8363	0.5865		
Total	35	78.3088				

S = 0.765852 R-cuad. = 79.78% R-cuad. (ajustado) = 73.79%

Observaciones inusuales de Reducción

Obs	Reducción	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estandar
6	0.27203	-1.07823	0.38293	1.35027	2.04 R
11	-2.48902	-1.07823	0.38293	-1.41079	-2.13 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P	N	Media	Agrupación
100	12	-1.4	A
175	12	-2.5	B
250	12	-4.1	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Rec	N	Media	Agrupación
1	12	-1.8	A
5	12	-2.9	B
3	12	-3.3	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P	Rec	N	Media	Agrupación
100	1	4	-1.0	A
100	5	4	-1.1	A B
175	1	4	-1.5	A B C
100	3	4	-2.1	A B C
175	5	4	-2.8	B C
250	1	4	-3.0	C D
175	3	4	-3.2	C D
250	5	4	-4.7	D
250	3	4	-4.7	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

J. Análisis de regresión para modelo predictivo de superficie de respuesta de reducción de cuentas de BMAs en leche cruda por PM de HAP

Regresión de superficie de respuesta: Red + vs. Pressure, Cycles

El análisis se realizó utilizando unidades codificadas.

Coefficientes de regresión estimados de Red +

Término	Coef	EE del coef.	T	P
Constante	3.2424	0.07707	42.069	0.000
Pressure	1.9004	0.09439	20.132	0.000
Cycles	1.2146	0.09439	12.867	0.000
Pressure*Cycles	0.2873	0.11561	2.485	0.026

S = 0.298133 PRESS = 2.22929
 R-cuad. = 97.63% R-cuad.(pred.) = 96.47% R-cuad.(ajustado) = 98.12%

Análisis de varianza de Red +

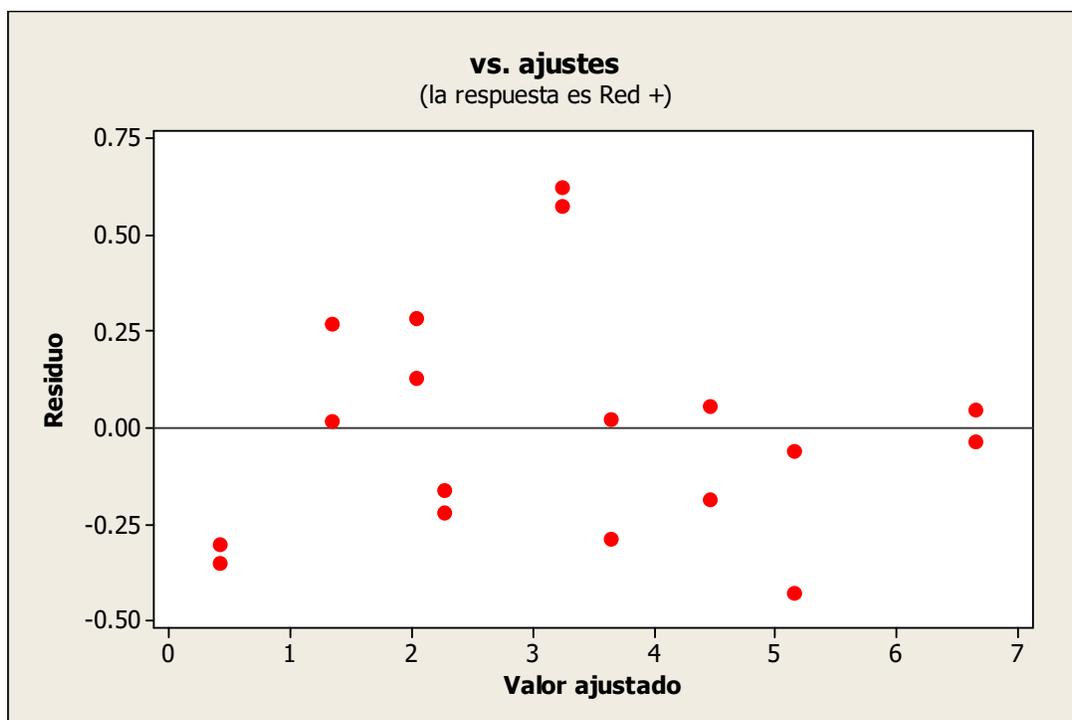
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Regresión	3	61.6991	61.6991	20.5664	192.34	0.000
Lineal	2	61.0390	61.0390	30.5195	285.43	0.000
Pressure	1	43.3360	43.3360	43.3360	405.30	0.000
Cycles	1	17.7030	17.7030	17.7030	165.57	0.000
interacción	1	0.6601	0.6601	0.6601	6.17	0.026

Pressure*Cycles	1	0.6601	0.6601	0.6601	6.17	0.026
Error residual	14	1.4969	1.4969	0.1069		
Falta de ajuste	5	1.2984	1.2984	0.2597	11.77	0.001
Error puro	9	0.1985	0.1985	0.0221		
Total	17	63.1961				

Coefficientes de regresión estimados de Red + utilizando datos en unidades no codificadas

Término	Coef
Constante	-2.06521
Pressure	0.0199530
Cycles	0.273724
Pressure*Cycles	0.00191501

Gráfica de residuales de respuestas observadas vs. predichas de reducción en cuentas de *BMA's* , mostrando que no hay una tendencia claramente observable y que establece la adecuación del modelo



K. Análisis de regresión para modelo predictivo de superficie de respuesta de reducción de cuentas de *S. aureus* en leche cruda por PM de HAP

Regresión de superficie de respuesta: 1/red vs. pressure, cycles

El análisis se realizó utilizando unidades codificadas.

Coefficientes de regresión estimados de 1/red

Término	Coef	EE del coef.	T	P
Constante	0.5564	0.03384	16.441	0.000
pressure	-0.3509	0.04145	-8.465	0.000
cycles	-0.3085	0.04145	-7.443	0.000
pressure*cycles	0.2387	0.05076	4.702	0.000

S = 0.143577 PRESS = 0.586640
R-cuad. = 91.42% R-cuad. (pred.) = 82.56% R-cuad. (ajustado) = 89.58%

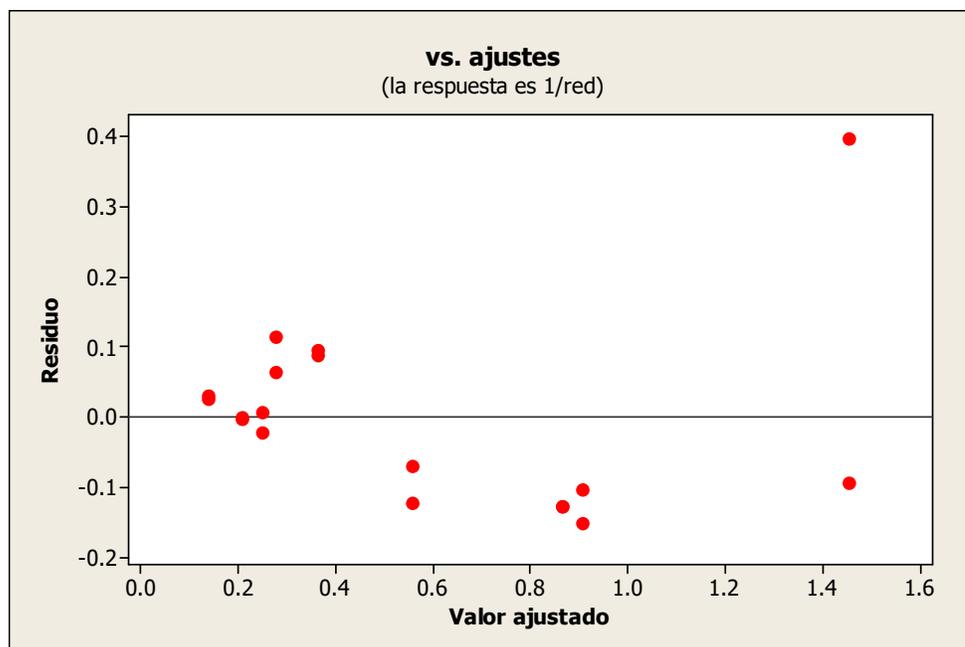
Análisis de varianza de 1/red

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Regresión	3	3.0751	3.0751	1.02502	49.72	0.000
Lineal	2	2.6192	2.6192	1.30961	63.53	0.000
pressure	1	1.4773	1.4773	1.47728	71.66	0.000
cycles	1	1.1420	1.1420	1.14195	55.40	0.000
interacción	1	0.4558	0.4558	0.45583	22.11	0.000
pressure*cycles	1	0.4558	0.4558	0.45583	22.11	0.000
Error residual	14	0.2886	0.2886	0.02061		
Falta de ajuste	5	0.1634	0.1634	0.03267	2.35	0.126
Error puro	9	0.1252	0.1252	0.01391		
Total	17	3.3637				

Coefficientes de regresión estimados de 1/red utilizando datos en unidades no codificadas

Término	Coef
Constante	2.67324
pressure	-0.00945224
cycles	-0.432727
pressure*cycles	0.00159134

Gráfica de residuales de respuestas observadas vs. predichas de reducción en cuentas de *S. aureus* , mostrando que no hay una tendencia claramente observable y que establece la adecuación del modelo



L. Cambios en tiempo de coagulación por renina de leche sometida a pases múltiples de HAP a presiones selectas

Modelo lineal general: RCT vs. Presion, Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presion	fijo	3	100, 175, 250
Pases	fijo	3	1, 3, 5

Análisis de varianza para RCT, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presion	2	943.44	943.44	471.72	150.89	0.000
Pases	2	80.65	80.65	40.33	12.90	0.002
Presion*Pases	4	310.32	310.32	77.58	24.82	0.000
Error	9	28.14	28.14	3.13		
Total	17	1362.55				

S = 1.76813 R-cuad. = 97.94% R-cuad.(ajustado) = 96.10%

Observaciones inusuales de RCT

Obs	RCT	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
15	77.5937	75.0038	1.2503	2.5900	2.07 R
16	72.4138	75.0038	1.2503	-2.5900	-2.07 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion	N	Media	Agrupación
250	6	72.5	A
100	6	62.4	B
175	6	54.8	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
5	6	65.1	A
3	6	64.3	A
1	6	60.3	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion	Pases	N	Media	Agrupación
250	5	2	80.0	A
250	3	2	75.0	A
100	3	2	64.2	B
100	5	2	63.1	B
250	1	2	62.4	B
100	1	2	59.9	B C
175	1	2	58.5	B C D
175	3	2	53.6	C D
175	5	2	52.3	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

M. Cambios en rendimiento potencial de leche sometida a pases múltiples de HAP a presiones selectas

Modelo lineal general: % Rendimiento vs. P (MPa), NP

Factor	Tipo	Niveles	Valores
P (MPa)	fijo	3	100, 175, 250
NP	fijo	3	1, 3, 5

Análisis de varianza para % Rendimiento, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
P (MPa)	2	962.73	962.73	481.37	30.96	0.000
NP	2	76.01	76.01	38.00	2.44	0.106
P (MPa)*NP	4	270.56	270.56	67.64	4.35	0.008
Error	27	419.76	419.76	15.55		
Total	35	1729.06				

S = 3.94292 R-cuad. = 75.72% R-cuad.(ajustado) = 68.53%

Observaciones inusuales de % Rendimiento

Obs	% Rendimiento	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
7	109.473	116.413	1.971	-6.940	-2.03 R
8	107.181	116.413	1.971	-9.233	-2.70 R
14	125.875	116.413	1.971	9.462	2.77 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P (MPa)	N	Media	Agrupación
250	12	129.1	A
175	12	119.7	B
100	12	117.0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

NP	N	Media	Agrupación
5	12	124.0	A
3	12	121.3	A
1	12	120.6	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P (MPa)	NP	N	Media	Agrupación
250	5	4	130.5	A
250	3	4	129.7	A
250	1	4	127.2	A B
100	5	4	123.2	A B C
175	3	4	122.6	A B C
175	1	4	118.3	B C D
175	5	4	118.3	B C D
100	1	4	116.4	C D
100	3	4	111.5	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Sección 4.3**N. Cambios en pH de leche sometida a tratamientos selectos de HAP****Modelo lineal general: pH vs. Presión, Pases**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presión	fijo	2	210, 250
Pases	fijo	6	0, 1, 2, 3, 4, 5

Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presión	1	0.386961	0.268502	0.268502	435.04	0.000
Pases	5	0.072528	0.072528	0.014506	23.50	0.000
Error	59	0.036415	0.036415	0.000617		
Total	65	0.495903				

S = 0.0248434 R-cuad. = 92.66% R-cuad.(ajustado) = 91.91%

Observaciones inusuales de pH

Obs	pH	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
37	6.64000	6.58521	0.00802	0.05479	2.33 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presión	N	Media	Agrupación
250	36	6.7	A
210	30	6.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
1	12	6.7	A
2	12	6.6	A B
3	12	6.6	B C
0	12	6.6	C
4	12	6.6	C
5	6	6.5	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

O. Cambios en L de leche sometida a tratamientos selectos de HAP**Modelo lineal general: L vs. Presión, Recirculación**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
P	fijo	2	210, 250
Pases	fijo	6	0, 1, 2, 3, 4, 5

Análisis de varianza para L, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
P	1	0.480	0.084	0.084	0.15	0.705
Pases	5	124.144	124.144	24.829	42.72	0.000
Error	59	34.290	34.290	0.581		
Total	65	158.914				

S = 0.762356 R-cuad. = 78.42% R-cuad.(ajustado) = 76.23%

Observaciones inusuales de L

Obs	L	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
43	70.2000	68.7292	0.2411	1.4708	2.03 R
44	70.1900	68.7292	0.2411	1.4608	2.02 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P	N	Media	Agrupación
210	36	69.7	A
250	30	69.6	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
1	12	72.2	A
2	12	70.5	B
3	12	69.7	B
4	12	68.8	C
5	6	68.4	C
0	12	68.3	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

P. Cambios en a de leche sometida a tratamientos selectos de HAP

Modelo lineal general: a vs. P, Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
P	fijo	2	210, 250
Pases	fijo	6	0, 1, 2, 3, 4, 5

Análisis de varianza para a, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
P	1	0.1324	0.0049	0.0049	0.05	0.821
Pases	5	16.6736	16.6736	3.3347	35.25	0.000
Error	59	5.5821	5.5821	0.0946		
Total	65	22.3881				

S = 0.307590 R-cuad. = 75.07% R-cuad.(ajustado) = 72.53%

Observaciones inusuales de a

Obs	a	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
4	-3.40000	-4.07433	0.09727	0.67433	2.31 R
5	-3.37000	-4.07433	0.09727	0.70433	2.41 R
43	-3.96000	-4.68483	0.09727	0.72483	2.48 R
44	-3.95000	-4.68483	0.09727	0.73483	2.52 R
45	-3.93000	-4.68483	0.09727	0.75483	2.59 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P	N	Media	Agrupación
210	36	-4.3	A
250	30	-4.3	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
0	12	-3.3	A
1	12	-4.1	B
2	12	-4.5	C
3	12	-4.5	C
4	12	-4.7	C
5	6	-4.9	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Q. Cambios en *b* de leche sometida a tratamientos selectos de HAP

Modelo lineal general: *b* vs. P, Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
P	fijo	2	210, 250
Pases	fijo	6	0, 1, 2, 3, 4, 5

Análisis de varianza para *b*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
P	1	3.318	0.491	0.491	0.94	0.336
Pases	5	104.332	104.332	20.866	40.02	0.000
Error	59	30.763	30.763	0.521		
Total	65	138.413				

S = 0.722085 R-cuad. = 77.77% R-cuad.(ajustado) = 75.51%

Observaciones inusuales de *b*

Obs	b	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
43	-2.35000	-4.06367	0.22834	1.71367	2.50 R
44	-2.33000	-4.06367	0.22834	1.73367	2.53 R
45	-2.43000	-4.06367	0.22834	1.63367	2.38 R
47	-5.55000	-4.06367	0.22834	-1.48633	-2.17 R
48	-5.51000	-4.06367	0.22834	-1.44633	-2.11 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

P	N	Media	Agrupación
250	30	-3.0	A
210	36	-3.2	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
0	12	-0.7	A
1	12	-2.1	B
2	12	-3.4	C
3	12	-3.7	C
4	12	-4.2	C
5	6	-4.4	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

R. Cambios en d_{43} de glóbulo graso de leche bovina sometida a pases múltiples de HAP a 210 y 250 MPa

Modelo lineal general: d_{43} vs. Presion, Pass

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presion	fijo	2	210, 250
Pass	fijo	4	1, 2, 3, 4

Análisis de varianza para d_{43} , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presion	1		9062	9062	9062	16.45	0.001
Pass	3		104165	104165	34722	63.02	0.000
Presion*Pass	3		157832	157832	52611	95.50	0.000
Error	16		8815	8815	551		
Total	23		279873				

S = 23.4718 R-cuad. = 96.85% R-cuad.(ajustado) = 95.47%

Observaciones inusuales de d_{43}

Obs	d_{43}	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
22	345.700	389.400	13.551	-43.700	-2.28 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion	N	Media	Agrupación
250	12	413.7	A
210	12	374.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pass	N	Media	Agrupación
3	6	497.8	A
1	6	382.9	B
2	6	381.9	B
4	6	314.5	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion	Pass	N	Media	Agrupación
250	3	3	646.8	A
210	4	3	389.4	B
250	2	3	386.3	B
210	1	3	383.6	B
250	1	3	382.1	B
210	2	3	377.5	B
210	3	3	348.8	B
250	4	3	239.6	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

S. Cambios en área superficial específica de glóbulo graso de leche bovina sometida a pases múltiples de HAP a 210 y 250 MPa.

Modelo lineal general: AS vs. Presion, Pases

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Presion	fijo	2	210, 250
Pases	fijo	4	1, 2, 3, 4

Análisis de varianza para AS, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Presion	1	0.810	0.810	0.810	0.69	0.419
Pases	3	184.871	184.871	61.624	52.36	0.000
Presion*Pases	3	275.799	275.799	91.933	78.11	0.000
Error	16	18.832	18.832	1.177		
Total	23	480.312				

S = 1.08490 R-cuad. = 96.08% R-cuad.(ajustado) = 94.36%

Observaciones inusuales de AS

Obs	AS	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
22	18.9477	16.9390	0.6264	2.0087	2.27 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Presion	N	Media	Agrupación
250	12	17.9	A
210	12	17.6	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Pases	N	Media	Agrupación
4	6	22.2	A
2	6	17.2	B
1	6	17.1	B
3	6	14.5	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

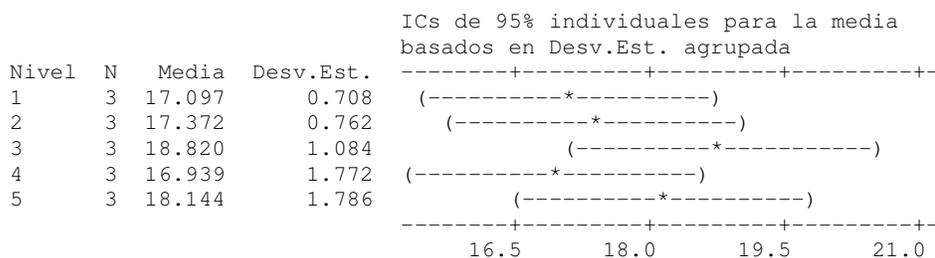
Presion	Pases	N	Media	Agrupación
250	4	3	27.4	A
210	3	3	18.8	B
210	2	3	17.4	B
250	1	3	17.1	B
210	1	3	17.1	B
250	2	3	17.0	B
210	4	3	16.9	B
250	3	3	10.1	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: ASup vs. NP 210

Fuente	GL	SC	CM	F	P
NP 210	4	7.50	1.87	1.09	0.412
Error	10	17.17	1.72		
Total	14	24.66			

S = 1.310 R-cuad. = 30.39% R-cuad.(ajustado) = 2.55%



Desv.Est. agrupada = 1.310

Agrupar información utilizando el método de Tukey

NP	N	Media	Agrupación
210	3	18.820	A
3	3	18.144	A
5	3	17.372	A
2	3	17.097	A
1	3	16.939	A
4	3	16.939	A

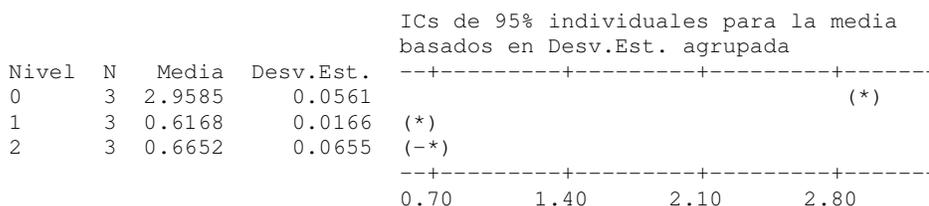
T. Cambios en carga proteica de glóbulo graso de leche bovina sometida a pases múltiples de HAP a 210 y 250 MPa

ANOVA unidireccional: Carga Prot vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	10.74498	5.37249	2090.11	0.000
Error	6	0.01542	0.00257		
Total	8	10.76040			

S = 0.05070 R-cuad. = 99.86% R-cuad.(ajustado) = 99.81%

0= Cruda; 1= HAP a 250 MPa, 2= HAP a 210 MPa



Desv.Est. agrupada = 0.0507

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0	3	2.9585	A
2	3	0.6652	B
1	3	0.6168	B

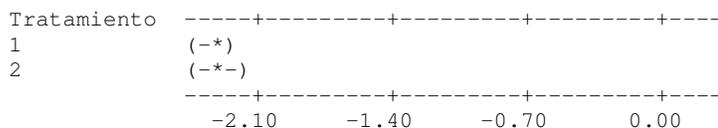
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 97.80%

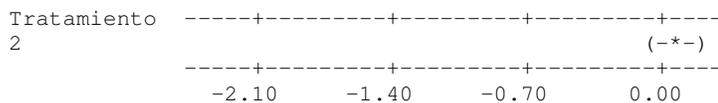
Tratamiento = 0 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
1	-2.4687	-2.3417	-2.2147
2	-2.4203	-2.2933	-2.1662



Tratamiento = 1 restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
2	-0.0786	0.0484	0.1754

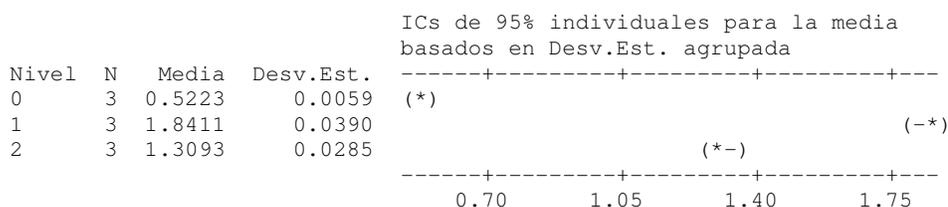


U. Cambios en proteína adsorbida en superficie de glóbulo graso de leche bovina sometida a pases múltiples de HAP a 210 y 250 MPa

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	2.641687	1.320843	1669.30	0.000
Error	6	0.004748	0.000791		
Total	8	2.646434			

S = 0.02813 R-cuad. = 99.82% R-cuad.(ajustado) = 99.76%

0= Cruda; 1= HAP a 250 MPa, 2= HAP a 210 MPa



Desv.Est. agrupada = 0.0281
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

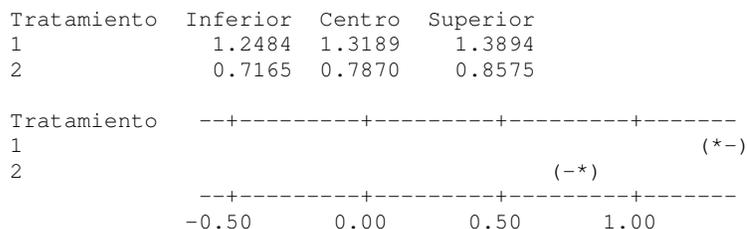
Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	3	1.8411	A
2	3	1.3093	B
0	3	0.5223	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

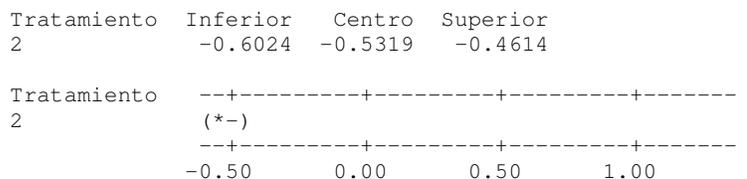
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 97.80%

Tratamiento = 0 restado de:

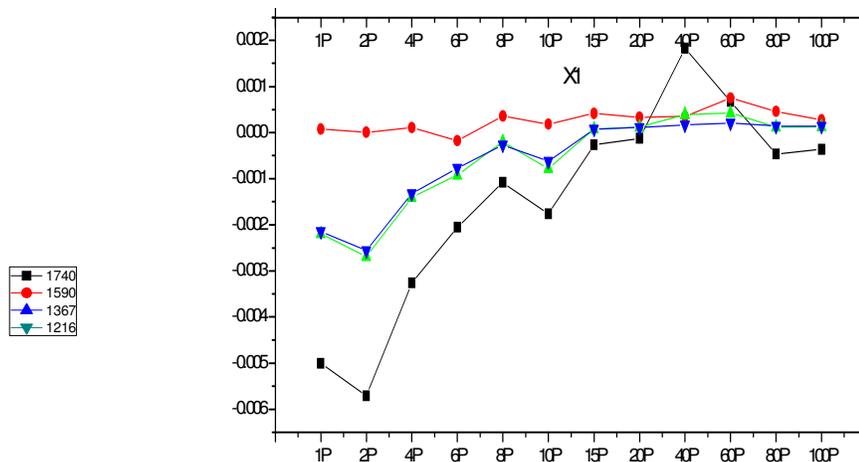


Tratamiento = 1 restado de:

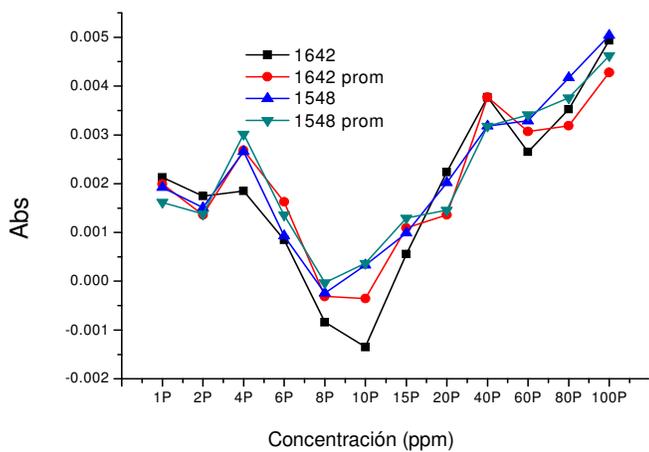


V. Gráficas de cambios de absorción vs variaciones en concentración de estándares de proteína láctea

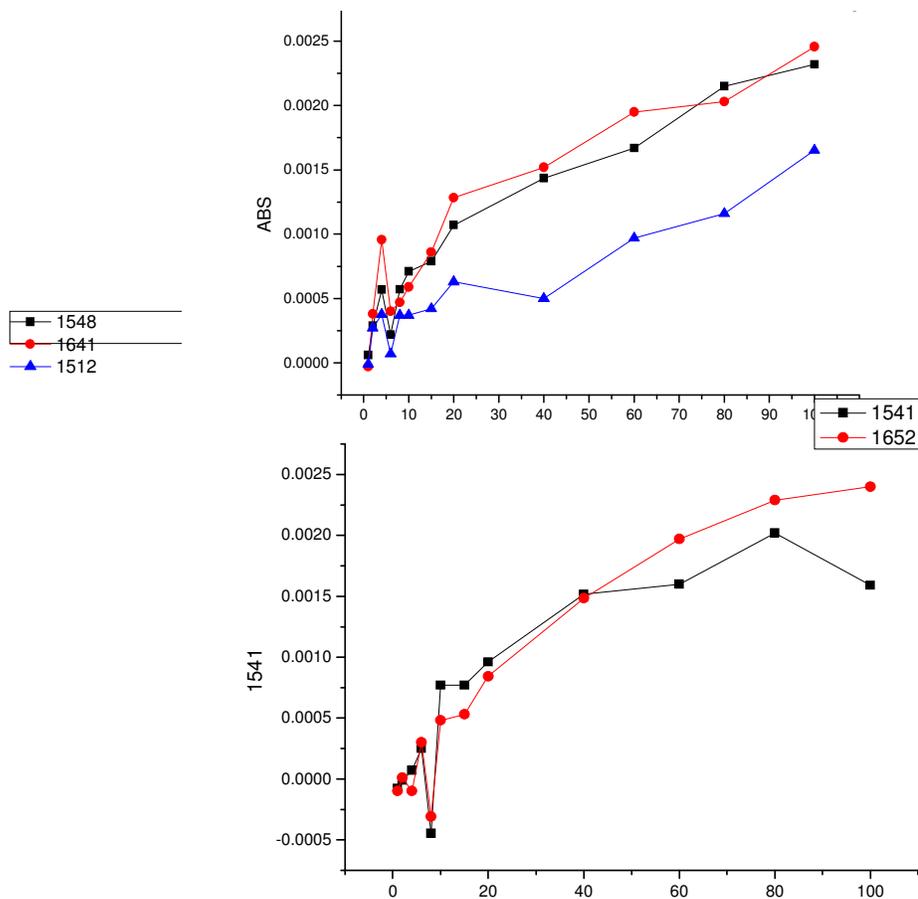
Betalactoglobulina



Alfa-Caseína



Beta-Caseína



Sección 4.4

W. Análisis de varianza de una sóla vía de rendimiento quesero de productos tratados por PM de HAP vs HTST

ANOVA unidireccional: Rendimiento (%) vs. Tipo de queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo de queso	2	17.142	8.571	13.33	0.001
Error	13	8.360	0.643		
Total	15	25.501			

S = 0.8019 R-cuad. = 67.22% R-cuad. (ajustado) = 62.18%

Nivel	N	Media	Desv.Est.
1	4	11.770	0.545
2	4	11.205	1.390
3	8	9.456	0.488

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Desv.Est. agrupada = 0.802
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

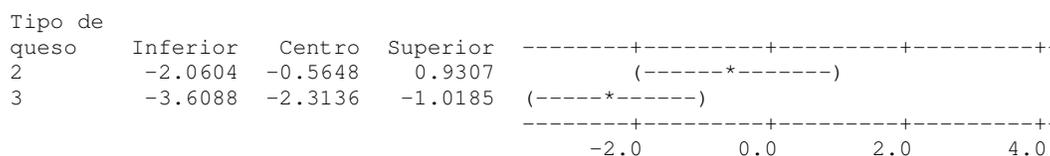
Tipo de queso	N	Media	Agrupación
1	4	11.7696	A
2	4	11.2047	A
3	8	9.4559	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

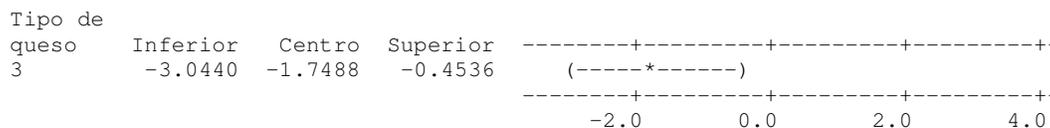
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo de queso

Nivel de confianza individual = 97.95%

Tipo de queso = 1 restado de:



Tipo de queso = 2 restado de:

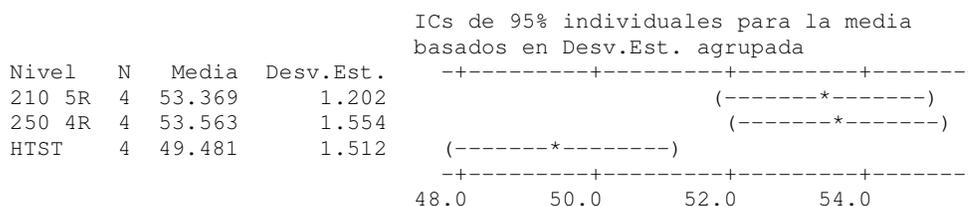


X. Análisis de varianza de una sólo vía de porcentaje de humedad de queso panela elaborado con leches tratada a PM de HAP vs HTST

ANOVA unidireccional: Humedad vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	42.41	21.21	10.35	0.005
Error	9	18.44	2.05		
Total	11	60.85			

S = 1.431 R-cuad. = 69.70% R-cuad.(ajustado) = 62.96%



Desv.Est. agrupada = 1.431

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
250 4R	4	53.563	A
210 5R	4	53.369	A
HTST	4	49.481	B

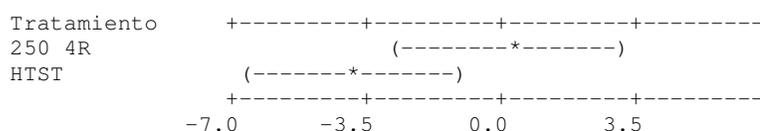
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 97.91%

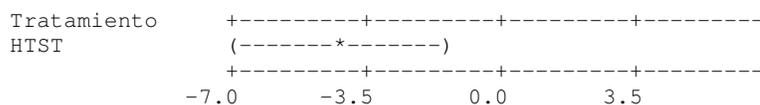
Tratamiento = 210 5R restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
250 4R	-2.633	0.194	3.021
HTST	-6.714	-3.887	-1.060



Tratamiento = 250 4R restado de:

Tratamiento	Inferior	Centro	Superior
HTST	-6.909	-4.082	-1.255

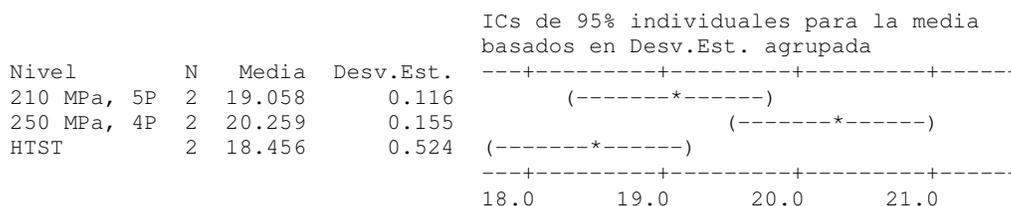


Y. Análisis de varianza de una sóla vía de porcentaje de proteína (base húmeda) de queso panela elaborado con leche tratada a PM de HAP vs HTST

ANOVA unidireccional: Promedio Proteína vs. Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Queso	2	3.371	1.685	16.22	0.025
Error	3	0.312	0.104		
Total	5	3.682			

S = 0.3224 R-cuad. = 91.53% R-cuad. (ajustado) = 85.89%



Desv.Est. agrupada = 0.322
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

Queso	N	Media	Agrupación
250 MPa, 4P	2	20.2590	A
210 MPa, 5P	2	19.0576	A B
HTST	2	18.4560	B

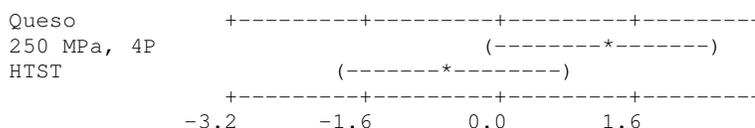
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Queso

Nivel de confianza individual = 97.50%

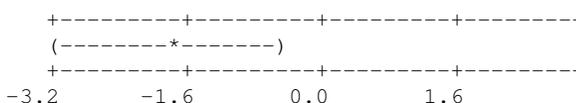
Queso = 210 MPa, 5P restado de:

Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	-0.1457	1.2014	2.5485
HTST	-1.9487	-0.6016	0.7455



Queso = 250 MPa, 4P restado de:

Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	-3.1501	-1.8030	-0.4559



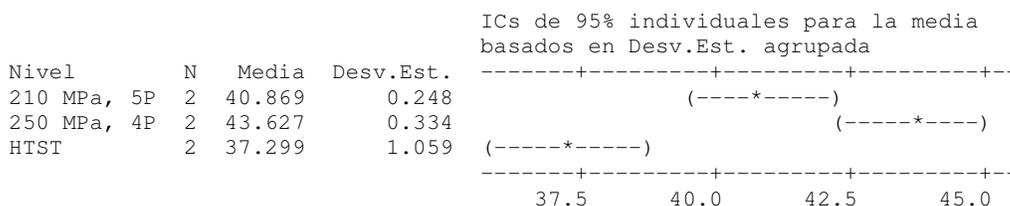
Desv.Est. agrupada = 0.322

Z. Análisis de varianza de una sóla vía de porcentaje de proteína en base seca de queso panela elaborado con leches tratada a PM de HAP vs HTST

ANOVA unidireccional: Proteína en bs vs. Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Queso	2	40.258	20.129	46.69	0.005
Error	3	1.293	0.431		
Total	5	41.552			

S = 0.6566 R-cuad. = 96.89% R-cuad.(ajustado) = 94.81%



Desv.Est. agrupada = 0.657
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

Queso	N	Media	Agrupación
250 MPa, 4P	2	43.627	A
210 MPa, 5P	2	40.869	B
HTST	2	37.299	C

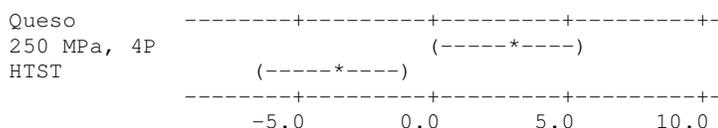
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Queso

Nivel de confianza individual = 97.50%

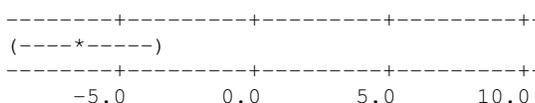
Queso = 210 MPa, 5P restado de:

Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	0.014	2.758	5.502
HTST	-6.314	-3.570	-0.826



Queso = 250 MPa, 4P restado de:

Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	-9.072	-6.328	-3.584

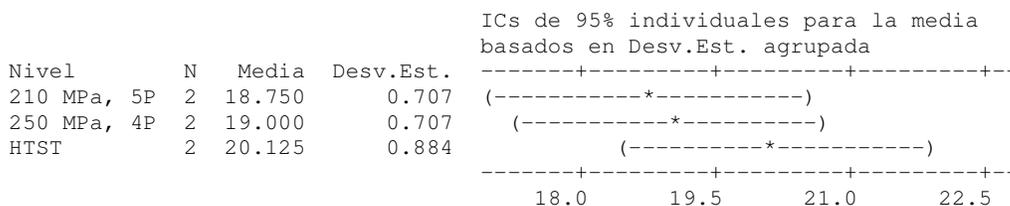


AA. Análisis de varianza de una sóla vía de porcentaje de grasa en base seca de queso panela elaborado con leches tratada a PM de HAP vs HTST

ANOVA unidireccional: Promedio grasa vs. Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Queso	2	2.146	1.073	1.81	0.305
Error	3	1.781	0.594		
Total	5	3.927			

S = 0.7706 R-cuad. = 54.64% R-cuad. (ajustado) = 24.40%



Desv.Est. agrupada = 0.771

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	2	20.1250	A
250 MPa, 4P	2	19.0000	A
210 MPa, 5P	2	18.7500	A

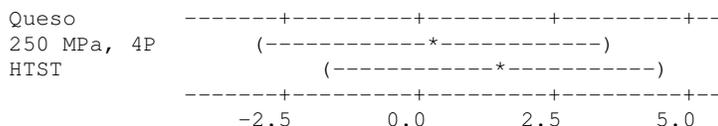
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Queso

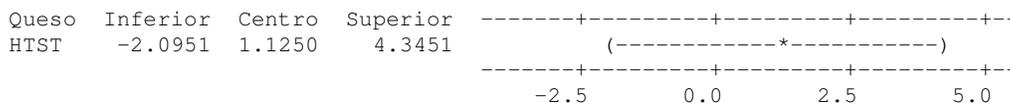
Nivel de confianza individual = 97.50%

Queso = 210 MPa, 5P restado de:

Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	-2.9701	0.2500	3.4701
HTST	-1.8451	1.3750	4.5951



Queso = 250 MPa, 4P restado de:

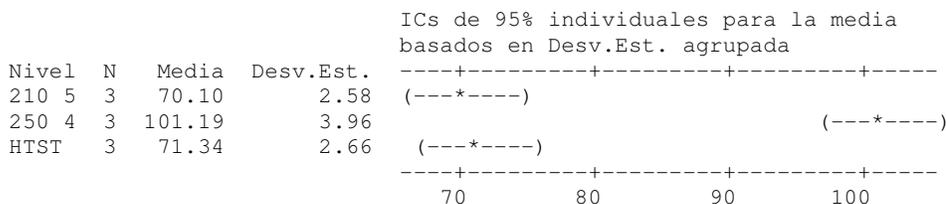


BB. Análisis de varianza de una sóla vía de sinéresis de queso panela elaborado con leches tratada a PM de HAP vs HTST tras 21 d de almacenamiento refrigerado

ANOVA unidireccional: Sinéresis 21 d (g) vs. Queso p Sin

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Queso p Sin	2	1859.53	929.76	94.92	0.000
Error	6	58.77	9.79		
Total	8	1918.30			

S = 3.130 R-cuad. = 96.94% R-cuad.(ajustado) = 95.92%



Desv.Est. agrupada = 3.13
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

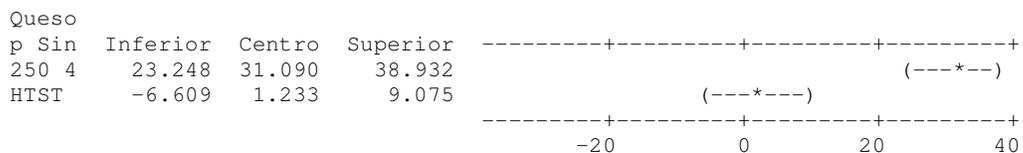
Queso				
p	Sin	N	Media	Agrupación
250	4	3	101.193	A
HTST		3	71.337	B
210	5	3	70.103	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

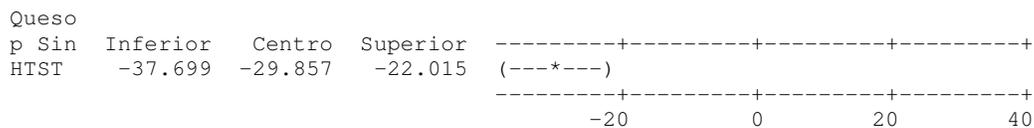
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Queso p Sin

Nivel de confianza individual = 97.80%

Queso p Sin = 210 5 restado de:



Queso p Sin = 250 4 restado de:



CC. Análisis de varianza de dureza de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: Dureza vs. Queso, Tiempo

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210 MPa, 5P, 250 MPa, 4P, HTST
Tiempo	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para Dureza, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	744981	744981	372490	16.41	0.000
Tiempo	3	578155	578155	192718	8.49	0.000
Queso*Tiempo	6	426363	426363	71061	3.13	0.014
Error	36	817087	817087	22697		
Total	47	2566586				

S = 150.655 R-cuad. = 68.16% R-cuad.(ajustado) = 58.44%

Observaciones inusuales de Dureza

Obs	Dureza	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
6	799.44	1078.77	75.33	-279.33	-2.14 R
37	804.50	1104.25	75.33	-299.75	-2.30 R
42	1234.00	945.12	75.33	288.88	2.21 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.
 Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	16	1016.3	A
250 MPa, 4P	16	908.6	A
210 MPa, 5P	16	715.2	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tiempo	N	Media	Agrupación
7	12	1016.9	A
14	12	957.7	A
21	12	787.1	B
1	12	758.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

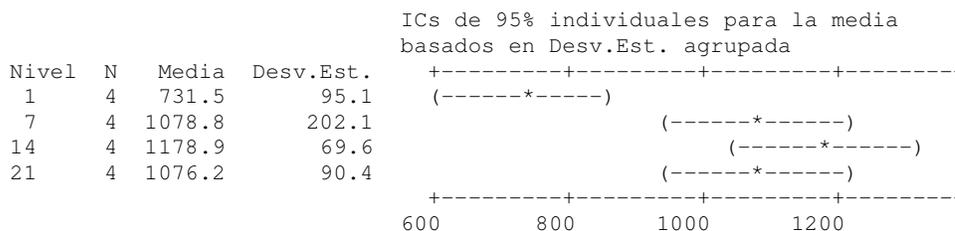
Queso	Tiempo	N	Media	Agrupación
HTST	14	4	1178.9	A
250 MPa, 4P	7	4	1104.3	A B
HTST	7	4	1078.8	A B C
HTST	21	4	1076.2	A B C
250 MPa, 4P	14	4	945.1	A B C
210 MPa, 5P	7	4	867.7	A B C D
250 MPa, 4P	1	4	804.6	B C D
250 MPa, 4P	21	4	780.3	B C D
210 MPa, 5P	14	4	749.0	B C D
210 MPa, 5P	1	4	739.2	B C D
HTST	1	4	731.5	C D
210 MPa, 5P	21	4	504.9	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Dureza Past vs. T Past

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T Past	3	460036	153345	9.76	0.002
Error	12	188614	15718		
Total	15	648650			

S = 125.4 R-cuad. = 70.92% R-cuad.(ajustado) = 63.65%



Desv.Est. agrupada = 125.4

Agrupar información utilizando el método de Tukey

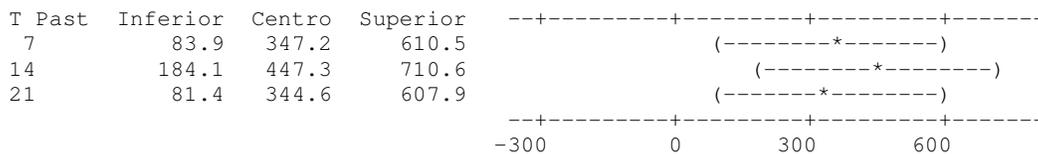
T Past	N	Media	Agrupación
14	4	1178.9	A
7	4	1078.8	A
21	4	1076.2	A
1	4	731.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

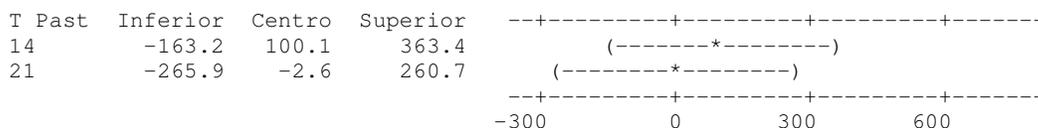
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de T Past

Nivel de confianza individual = 98.83%

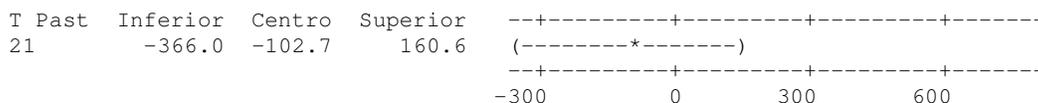
T Past = 1 restado de:



T Past = 7 restado de:



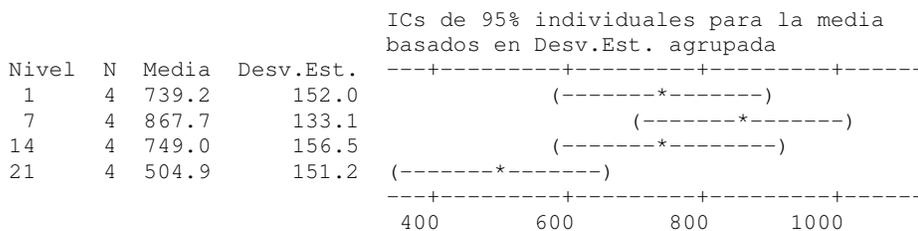
T Past = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Dureza 210 vs. T 210

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T 210	3	276948	92316	4.19	0.030
Error	12	264456	22038		
Total	15	541404			

S = 148.5 R-cuad. = 51.15% R-cuad. (ajustado) = 38.94%



Desv.Est. agrupada = 148.5

Agrupar información utilizando el método de Tukey

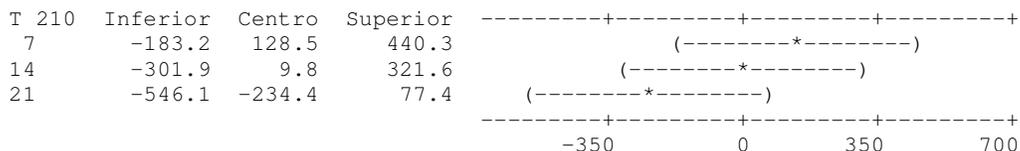
T 210	N	Media	Agrupación
7	4	867.7	A
14	4	749.0	A B
1	4	739.2	A B
21	4	504.9	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

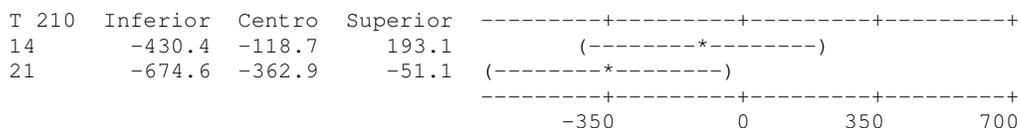
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de T 210

Nivel de confianza individual = 98.83%

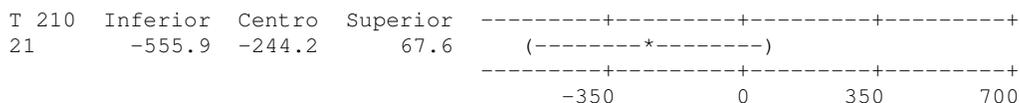
T 210 = 1 restado de:



T 210 = 7 restado de:



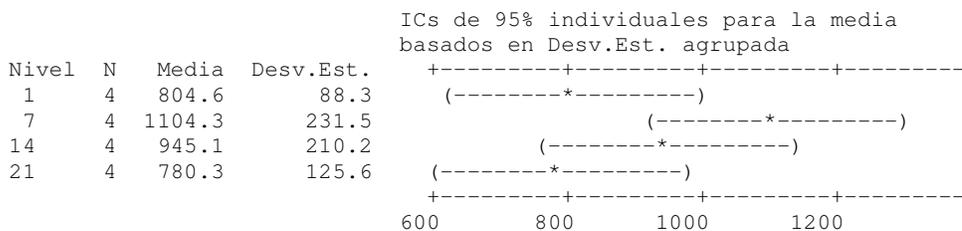
T 210 = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Dureza 250 vs. T 250

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T 250	3	267535	89178	2.94	0.076
Error	12	364016	30335		
Total	15	631551			

S = 174.2 R-cuad. = 42.36% R-cuad.(ajustado) = 27.95%



Desv.Est. agrupada = 174.2

Agrupar información utilizando el método de Tukey

T 250	N	Media	Agrupación
7	4	1104.3	A
14	4	945.1	A
1	4	804.6	A
21	4	780.3	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

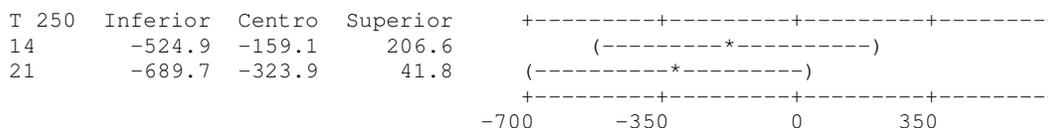
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de T 250

Nivel de confianza individual = 98.83%

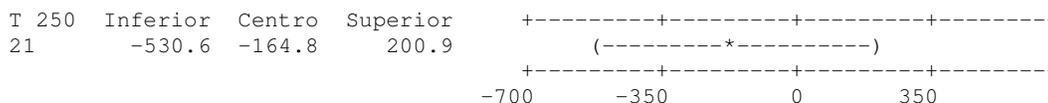
T 250 = 1 restado de:



T 250 = 7 restado de:



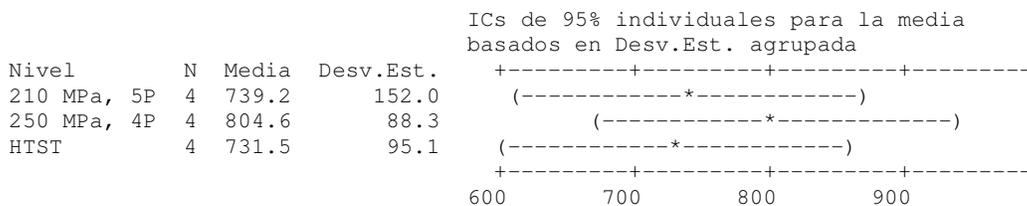
T 250 = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Día 1 vs. Tipo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo	2	12902	6451	0.48	0.631
Error	9	119781	13309		
Total	11	132683			

S = 115.4 R-cuad. = 9.72% R-cuad.(ajustado) = 0.00%



Desv.Est. agrupada = 115.4
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo	N	Media	Agrupación
250 MPa, 4P	4	804.6	A
210 MPa, 5P	4	739.2	A
HTST	4	731.5	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo = 210 MPa, 5P restado de:

Tipo	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	-162.5	65.4	293.2
HTST	-235.5	-7.7	220.2



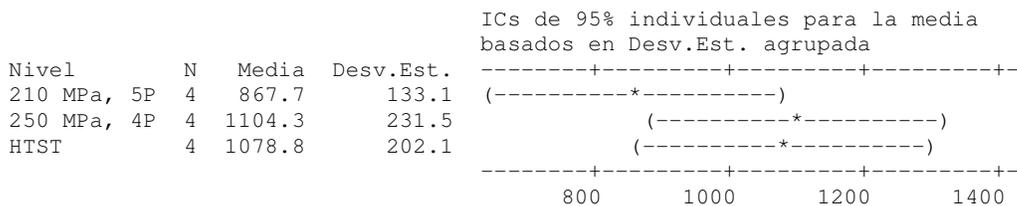
Tipo = 250 MPa, 4P restado de:

Tipo	Inferior	Centro	Superior
HTST	-300.9	-73.1	154.8

ANOVA unidireccional: Día 7 vs. Tipo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo	2	134830	67415	1.80	0.219
Error	9	336317	37369		
Total	11	471147			

S = 193.3 R-cuad. = 28.62% R-cuad.(ajustado) = 12.75%



Desv.Est. agrupada = 193.3

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo	N	Media	Agrupación
250 MPa, 4P	4	1104.3	A
HTST	4	1078.8	A
210 MPa, 5P	4	867.7	A

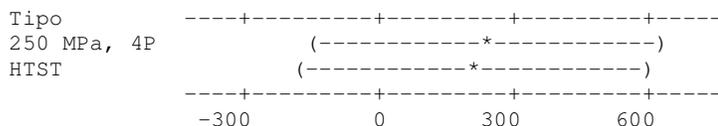
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo

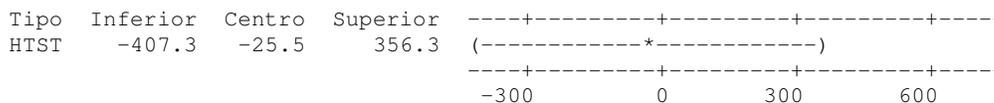
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo = 210 MPa, 5P restado de:

Tipo	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	-145.3	236.5	618.3
HTST	-170.8	211.0	592.8



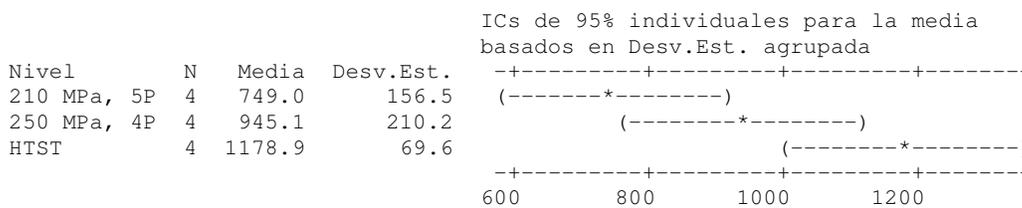
Tipo = 250 MPa, 4P restado de:



ANOVA unidireccional: Día 14 vs. Tipo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo	2	370486	185243	7.56	0.012
Error	9	220611	24512		
Total	11	591096			

S = 156.6 R-cuad. = 62.68% R-cuad.(ajustado) = 54.38%



Desv.Est. agrupada = 156.6

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo	N	Media	Agrupación
HTST	4	1178.9	A
250 MPa, 4P	4	945.1	A B
210 MPa, 5P	4	749.0	B

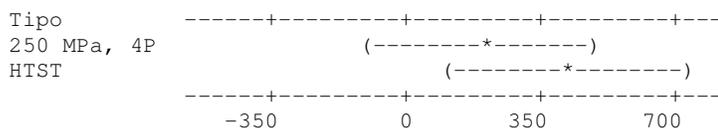
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo = 210 MPa, 5P restado de:

Tipo	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	-113.1	196.1	505.3
HTST	120.6	429.8	739.1



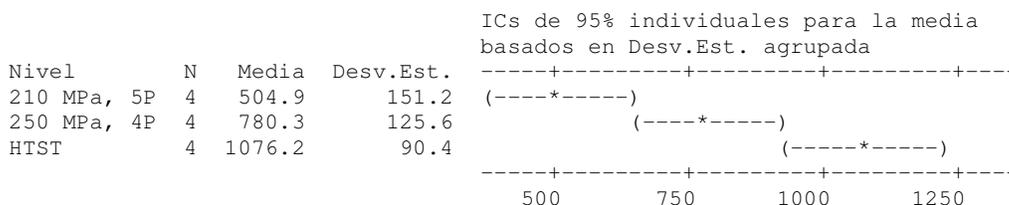
Tipo = 250 MPa, 4P restado de:



ANOVA unidireccional: Día 21 vs. Tipo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo	2	653127	326563	20.94	0.000
Error	9	140378	15598		
Total	11	793505			

S = 124.9 R-cuad. = 82.31% R-cuad.(ajustado) = 78.38%



Desv.Est. agrupada = 124.9

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo	N	Media	Agrupación
HTST	4	1076.2	A
250 MPa, 4P	4	780.3	B
210 MPa, 5P	4	504.9	C

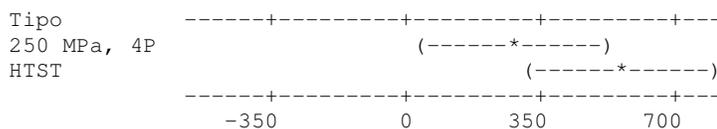
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo = 210 MPa, 5P restado de:

Tipo	Inferior	Centro	Superior
250 MPa, 4P	28.8	275.5	522.1
HTST	324.7	571.3	818.0



Tipo = 250 MPa, 4P restado de:



DD. Análisis de varianza de cohesividad de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: Cohesividad vs. Queso, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210 MPa, 5P, 250 MPa, 4P, HTST
Día	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para Cohesividad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	0.147672	0.147672	0.073836	53.47	0.000
Día	3	0.002228	0.002228	0.000743	0.54	0.659
Queso*Día	6	0.019968	0.019968	0.003328	2.41	0.046
Error	36	0.049713	0.049713	0.001381		
Total	47	0.219581				

S = 0.0371607 R-cuad. = 77.36% R-cuad.(ajustado) = 70.44%

Observaciones inusuales de Cohesividad

Obs	Cohesividad	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
1	0.305497	0.380633	0.018580	-0.075136	-2.33 R
13	0.222936	0.314360	0.018580	-0.091423	-2.84 R
16	0.390021	0.314360	0.018580	0.075661	2.35 R
39	0.149885	0.220244	0.018580	-0.070359	-2.19 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	16	0.3	A
210 MPa, 5P	16	0.3	B
250 MPa, 4P	16	0.2	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	N	Media	Agrupación
1	12	0.3	A
7	12	0.3	A
21	12	0.3	A
14	12	0.3	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	Día	N	Media	Agrupación
HTST	1	4	0.4	A
HTST	14	4	0.3	A B
HTST	21	4	0.3	A B
HTST	7	4	0.3	A B C
210 MPa, 5P	7	4	0.3	B C D
210 MPa, 5P	21	4	0.3	B C D E

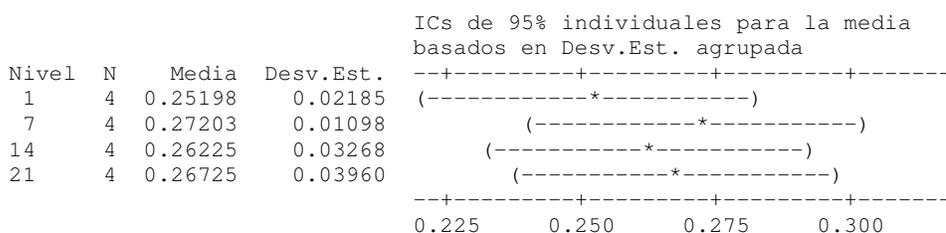
210 MPa, 5P	14	4	0.3	B C D E
210 MPa, 5P	1	4	0.3	B C D E
250 MPa, 4P	7	4	0.2	C D E
250 MPa, 4P	21	4	0.2	D E
250 MPa, 4P	1	4	0.2	D E
250 MPa, 4P	14	4	0.2	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Queso 210 vs. Día Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día Q	3	0.000884	0.000295	0.36	0.780
Error	12	0.009703	0.000809		
Total	15	0.010587			

S = 0.02844 R-cuad. = 8.35% R-cuad.(ajustado) = 0.00%



Desv.Est. agrupada = 0.02844

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día Q	N	Media	Agrupación
7	4	0.27203	A
21	4	0.26725	A
14	4	0.26225	A
1	4	0.25198	A

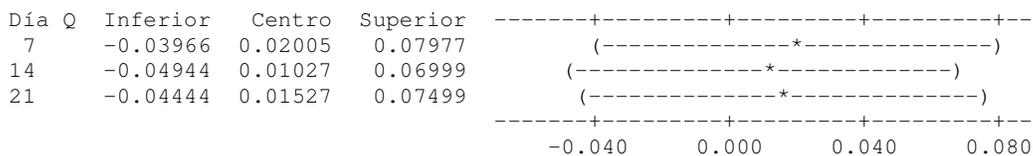
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

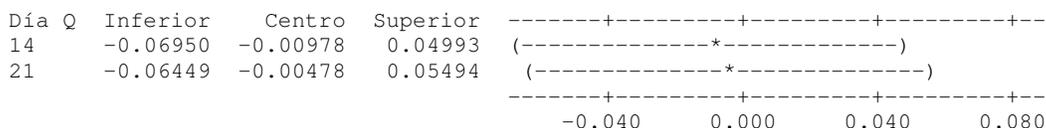
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día Q

Nivel de confianza individual = 98.83%

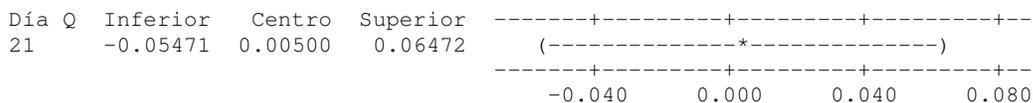
Día Q = 1 restado de:



Día Q = 7 restado de:



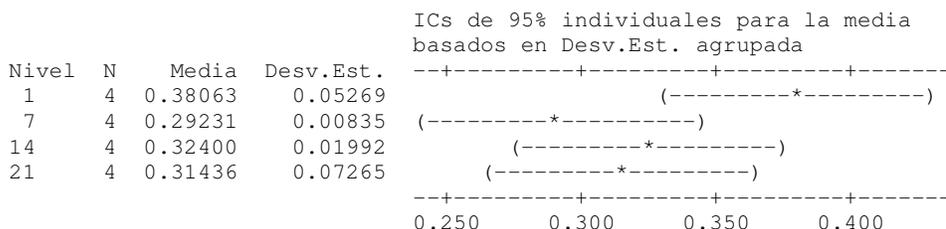
Día Q = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Queso HTST vs. Día Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día Q	3	0.01698	0.00566	2.66	0.096
Error	12	0.02557	0.00213		
Total	15	0.04255			

S = 0.04616 R-cuad. = 39.91% R-cuad.(ajustado) = 24.89%



Desv.Est. agrupada = 0.04616

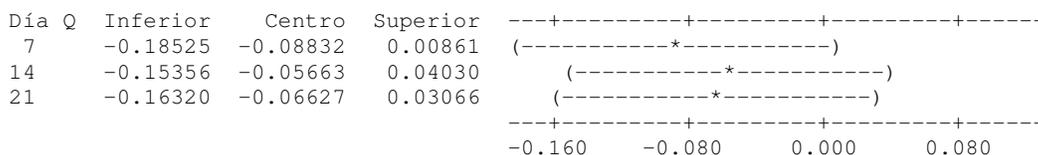
Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día Q	N	Media	Agrupación
1	4	0.38063	A
14	4	0.32400	A
21	4	0.31436	A
7	4	0.29231	A

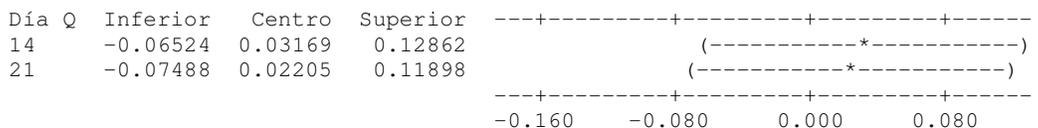
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día Q

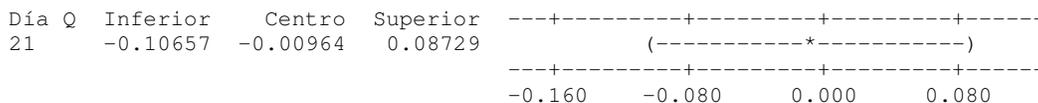
Nivel de confianza individual = 98.83%
 Día Q = 1 restado de:



Día Q = 7 restado de:



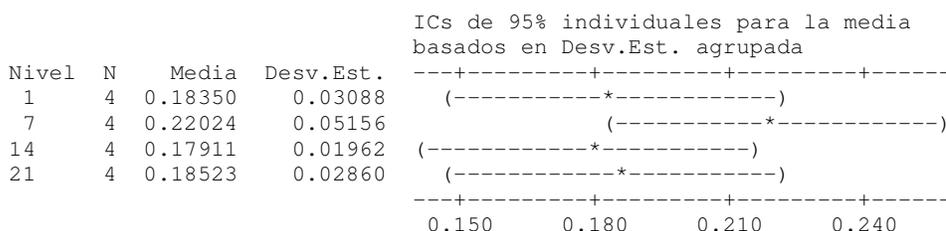
Día Q = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Queso 250 vs. Día Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día Q	3	0.00433	0.00144	1.20	0.352
Error	12	0.01444	0.00120		
Total	15	0.01877			

S = 0.03469 R-cuad. = 23.06% R-cuad.(ajustado) = 3.82%



Desv.Est. agrupada = 0.03469

Agrupar información utilizando el método de Tukey

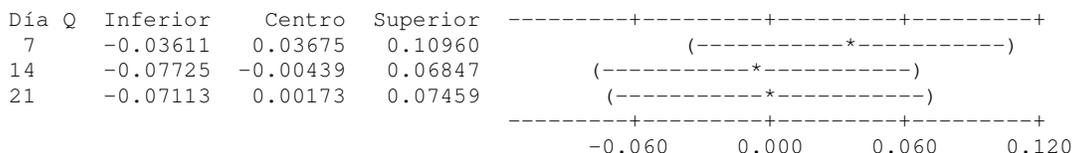
Día Q	N	Media	Agrupación
7	4	0.22024	A
21	4	0.18523	A
1	4	0.18350	A
14	4	0.17911	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

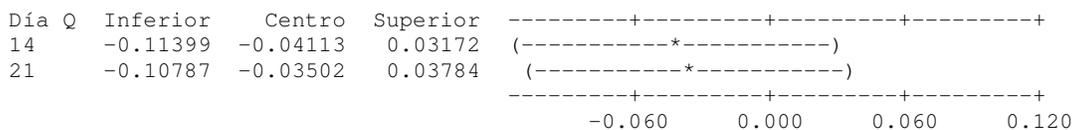
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día Q

Nivel de confianza individual = 98.83%

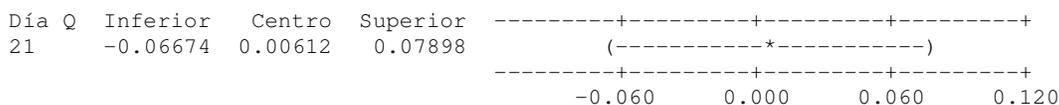
Día Q = 1 restado de:



Día Q = 7 restado de:



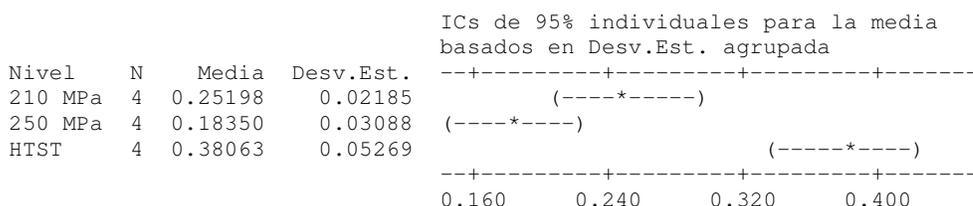
Día Q = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Día 1 vs. Tipo Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Q	2	0.08014	0.04007	28.57	0.000
Error	9	0.01262	0.00140		
Total	11	0.09276			

S = 0.03745 R-cuad. = 86.39% R-cuad.(ajustado) = 83.37%



Desv.Est. agrupada = 0.03745

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Q	N	Media	Agrupación
HTST	4	0.38063	A
210 MPa	4	0.25198	B
250 MPa	4	0.18350	B

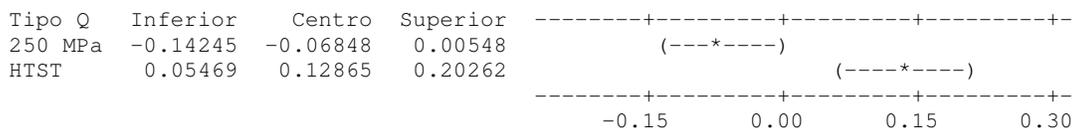
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

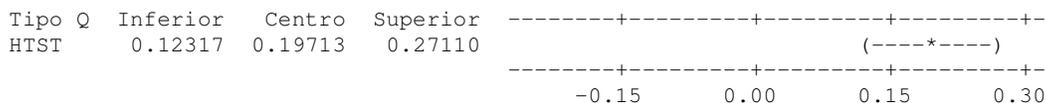
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Q

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Q = 210 MPa restado de:



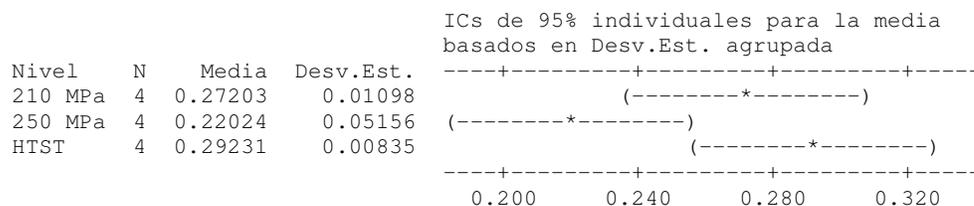
Tipo Q = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Día 7 vs. Tipo Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Q	2	0.011049	0.005525	5.82	0.024
Error	9	0.008545	0.000949		
Total	11	0.019594			

S = 0.03081 R-cuad. = 56.39% R-cuad.(ajustado) = 46.70%



Desv.Est. agrupada = 0.03081

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Q	N	Media	Agrupación
HTST	4	0.29231	A
210 MPa	4	0.27203	A B
250 MPa	4	0.22024	B

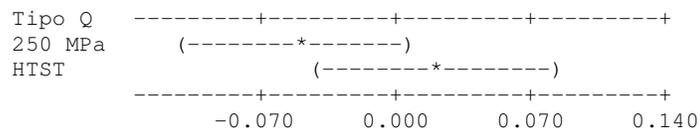
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Q

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Q = 210 MPa restado de:

Tipo Q	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.11264	-0.05179	0.00907
HTST	-0.04057	0.02028	0.08114



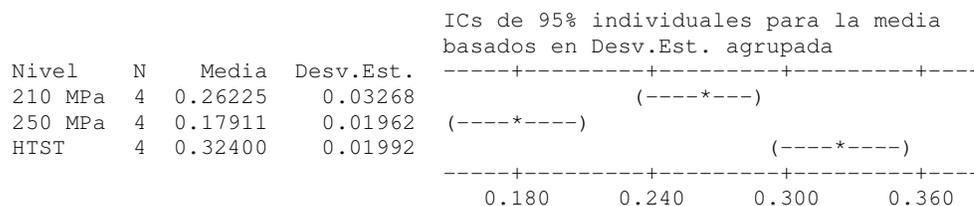
Tipo Q = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Día 14 vs. Tipo Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Q	2	0.042290	0.021145	34.29	0.000
Error	9	0.005550	0.000617		
Total	11	0.047840			

S = 0.02483 R-cuad. = 88.40% R-cuad. (ajustado) = 85.82%



Desv.Est. agrupada = 0.02483

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Q	N	Media	Agrupación
HTST	4	0.32400	A
210 MPa	4	0.26225	B
250 MPa	4	0.17911	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

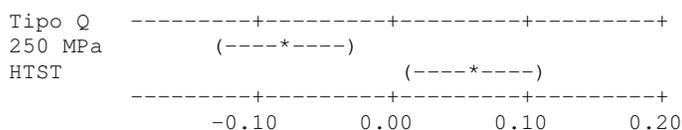
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Q

Nivel de confianza individual = 97.91%

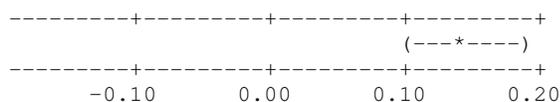
Tipo Q = 210 MPa restado de:

Tipo Q	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.13218	-0.08314	-0.03410
HTST	0.01271	0.06175	0.11079



Tipo Q = 250 MPa restado de:

Tipo Q	Inferior	Centro	Superior
HTST	0.09585	0.14489	0.19393

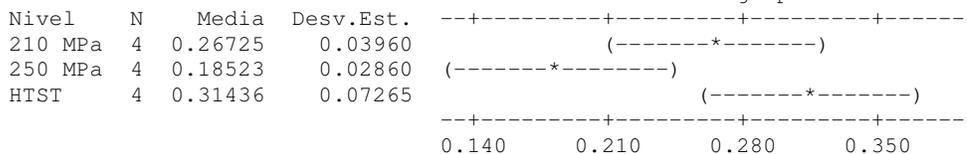


ANOVA unidireccional: Día 21 vs. Tipo Q

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Q	2	0.03416	0.01708	6.69	0.017
Error	9	0.02300	0.00256		
Total	11	0.05716			

S = 0.05055 R-cuad. = 59.77% R-cuad. (ajustado) = 50.83%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada



Desv.Est. agrupada = 0.05055

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Q	N	Media	Agrupación
HTST	4	0.31436	A
210 MPa	4	0.26725	A B
250 MPa	4	0.18523	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Q

EE. Análisis de varianza de luminosidad de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: L vs. Queso, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210, 250, HTST
Día	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para L, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	27.126	27.126	13.563	8.07	0.001
Día	3	92.143	92.143	30.714	18.28	0.000
Queso*Día	6	20.742	20.742	3.457	2.06	0.083
Error	36	60.498	60.498	1.680		
Total	47	200.509				

S = 1.29634 R-cuad. = 69.83% R-cuad.(ajustado) = 60.61%
Observaciones inusuales de L

Obs	L	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
13	90.2767	87.3550	0.6482	2.9217	2.60 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	16	86.6	A
210	16	85.9	A B
250	16	84.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	N	Media	Agrupación
1	12	87.8	A
7	12	86.2	B
14	12	85.0	B C
21	12	84.1	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

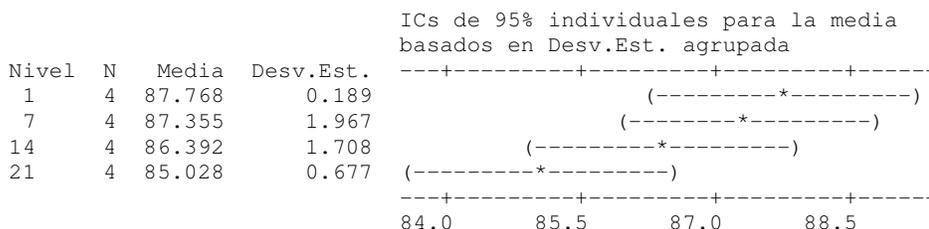
Queso	Día	N	Media	Agrupación
210	1	4	89.2	A
HTST	1	4	87.8	A B
HTST	7	4	87.4	A B C
HTST	14	4	86.4	A B C D
250	1	4	86.4	A B C D
210	7	4	85.7	B C D E
250	7	4	85.7	B C D E
HTST	21	4	85.0	B C D E
210	21	4	84.5	C D E
250	14	4	84.5	C D E
210	14	4	84.1	D E
250	21	4	82.7	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: L HTST vs. Día

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	17.77	5.92	3.25	0.060
Error	12	21.85	1.82		
Total	15	39.61			

S = 1.349 R-cuad. = 44.86% R-cuad.(ajustado) = 31.07%



Desv.Est. agrupada = 1.349

Agrupar información utilizando el método de Tukey

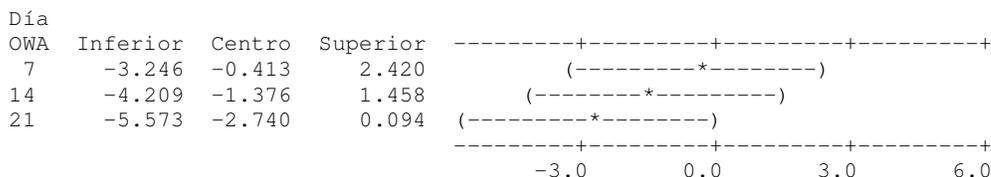
Día	N	Media	Agrupación
OWA 1	4	87.768	A
7	4	87.355	A
14	4	86.392	A
21	4	85.028	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

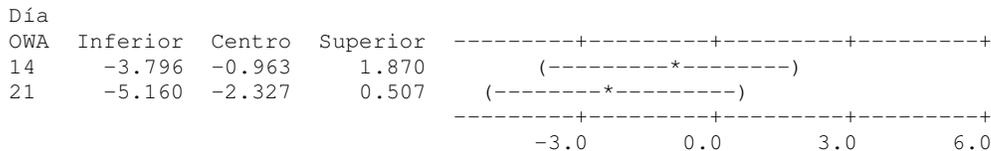
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

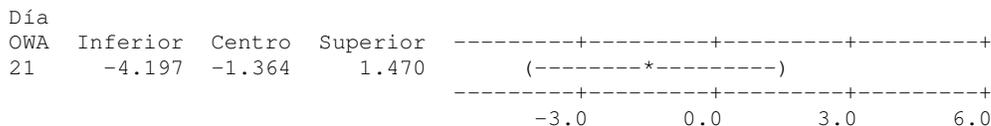
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



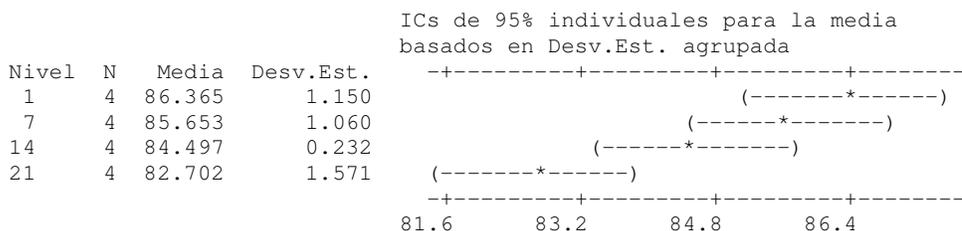
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: L 250 vs. Día

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	30.69	10.23	8.24	0.003
Error	12	14.90	1.24		
Total	15	45.59			

S = 1.114 R-cuad. = 67.31% R-cuad.(ajustado) = 59.14%



Desv.Est. agrupada = 1.114

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	OWA	N	Media	Agrupación
	1	4	86.365	A
	7	4	85.653	A
	14	4	84.497	A B
	21	4	82.702	B

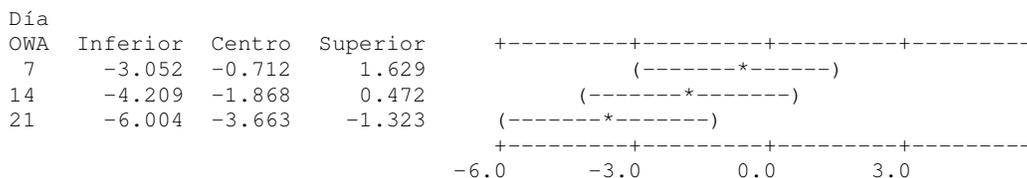
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

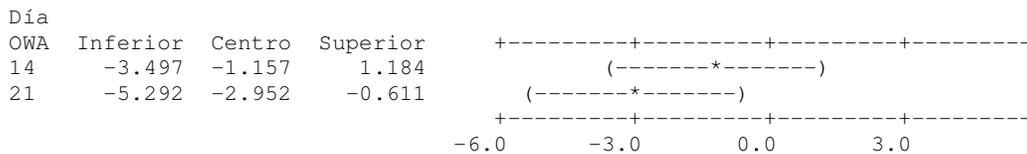
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

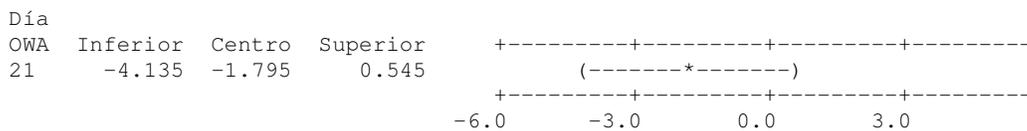
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



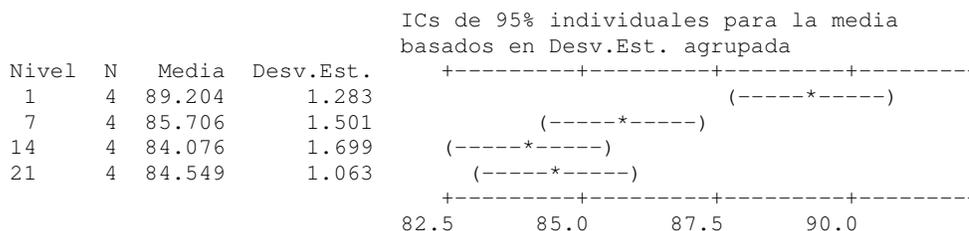
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: L 210 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	64.43	21.48	10.85	0.001
Error	12	23.75	1.98		
Total	15	88.17			

S = 1.407 R-cuad. = 73.07% R-cuad.(ajustado) = 66.33%



Desv.Est. agrupada = 1.407

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	N	Media	Agrupación
OWA 1	4	89.204	A
7	4	85.706	B
21	4	84.549	B
14	4	84.076	B

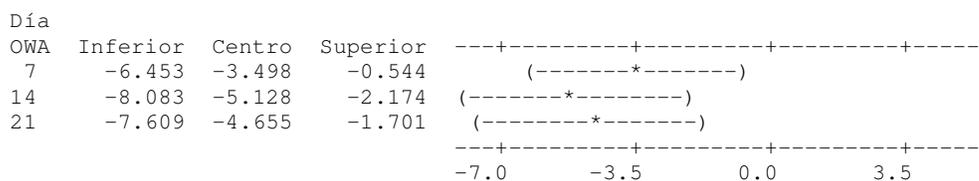
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

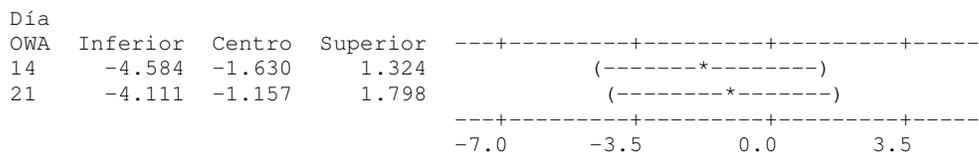
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

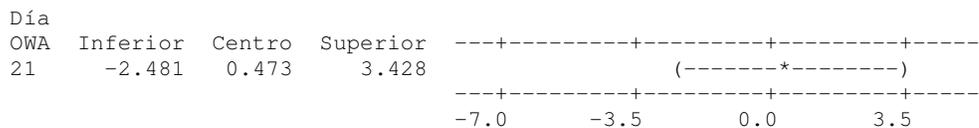
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



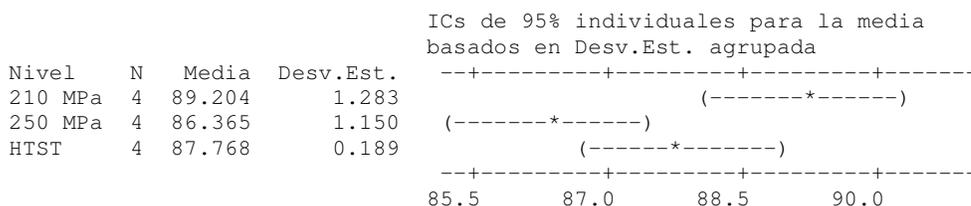
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 1 L vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	16.12	8.06	8.05	0.010
Error	9	9.01	1.00		
Total	11	25.14			

S = 1.001 R-cuad. = 64.14% R-cuad.(ajustado) = 56.17%



Desv.Est. agrupada = 1.001
Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
210 MPa	4	89.204	A
HTST	4	87.768	A B
250 MPa	4	86.365	B

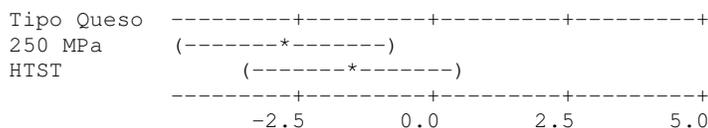
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

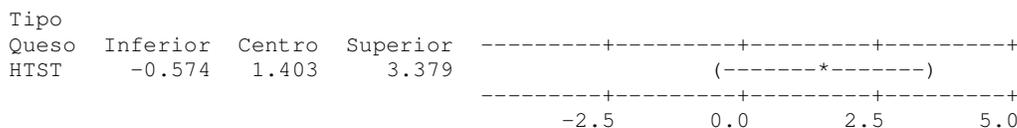
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-4.816	-2.839	-0.863
HTST	-3.413	-1.436	0.540



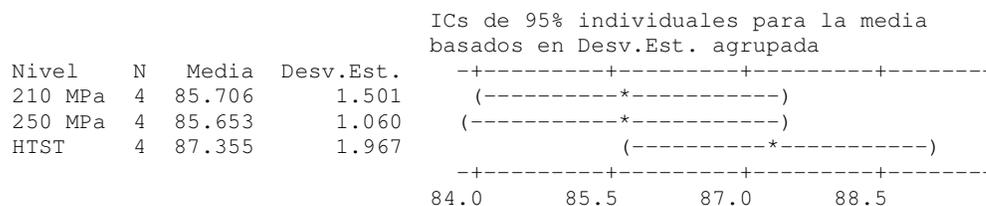
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 7 L vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	7.49	3.75	1.55	0.264
Error	9	21.74	2.42		
Total	11	29.23			

S = 1.554 R-cuad. = 25.63% R-cuad.(ajustado) = 9.10%



Desv.Est. agrupada = 1.554

Agrupar información utilizando el método de Tukey

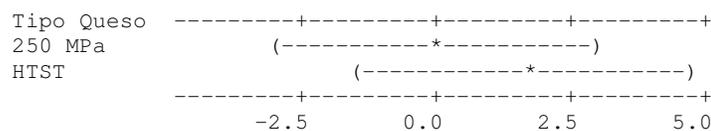
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	87.355	A
210 MPa	4	85.706	A
250 MPa	4	85.653	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

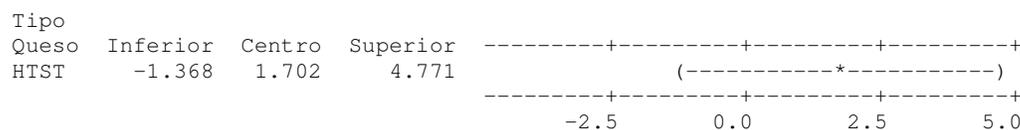
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-3.122	-0.053	3.017
HTST	-1.420	1.649	4.719



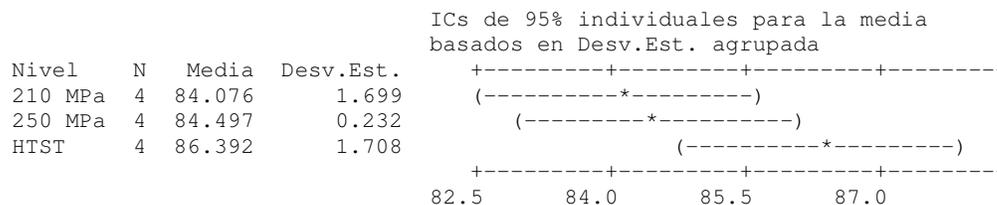
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 14 L vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	12.18	6.09	3.12	0.094
Error	9	17.57	1.95		
Total	11	29.75			

S = 1.397 R-cuad. = 40.94% R-cuad. (ajustado) = 27.81%



Desv.Est. agrupada = 1.397

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	86.392	A
250 MPa	4	84.497	A
210 MPa	4	84.076	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

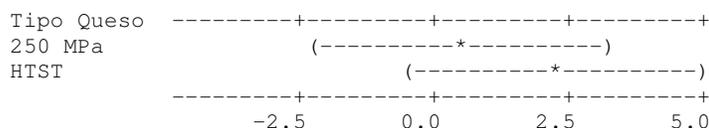
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-2.339	0.421	3.181
HTST	-0.444	2.316	5.076



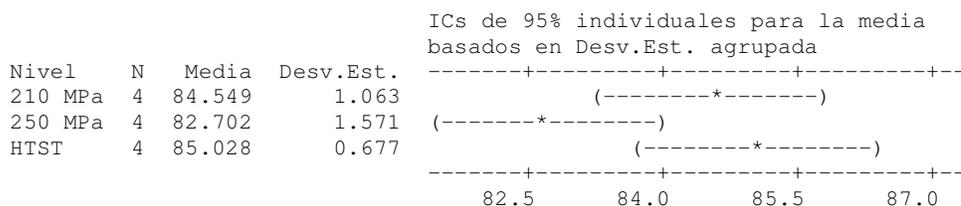
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 21 L vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	12.07	6.04	4.46	0.045
Error	9	12.17	1.35		
Total	11	24.25			

S = 1.163 R-cuad. = 49.80% R-cuad. (ajustado) = 38.65%



Desv.Est. agrupada = 1.163

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	85.028	A
210 MPa	4	84.549	A B
250 MPa	4	82.702	B

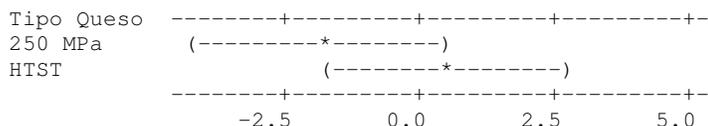
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-4.144	-1.848	0.449
HTST	-1.818	0.479	2.776



Tipo Queso = 250 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	0.030	2.327	4.623

FF. Análisis de varianza de a de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210, 250, HTST
Día	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para a, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	1.9570	1.9570	0.9785	6.43	0.004
Día	3	3.5597	3.5597	1.1866	7.79	0.000
Queso*Día	6	0.6490	0.6490	0.1082	0.71	0.643
Error	36	5.4810	5.4810	0.1522		
Total	47	11.6466				

S = 0.390191 R-cuad. = 52.94% R-cuad.(ajustado) = 38.56%
 Observaciones inusuales de a

Obs	a	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
13	1.93333	2.66833	0.19510	-0.73500	-2.18 R
37	1.77833	2.52958	0.19510	-0.75125	-2.22 R
45	1.24667	1.93250	0.19510	-0.68583	-2.03 R
48	2.66333	1.93250	0.19510	0.73083	2.16 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	16	2.4	A
250	16	2.2	A B
210	16	1.9	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	N	Media	Agrupación
14	12	2.4	A
7	12	2.4	A
21	12	2.3	A
1	12	1.7	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

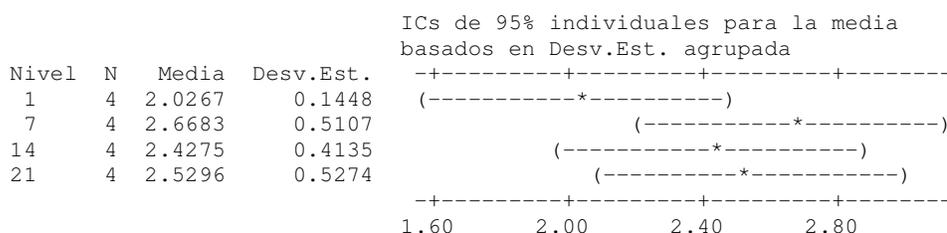
Queso	Día	N	Media	Agrupación
HTST	7	4	2.7	A
HTST	21	4	2.5	A
250	7	4	2.5	A
HTST	14	4	2.4	A
210	14	4	2.4	A
250	14	4	2.4	A
250	21	4	2.3	A B
HTST	1	4	2.0	A B
210	7	4	2.0	A B
210	21	4	1.9	A B
250	1	4	1.8	A B
210	1	4	1.4	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: a HTST vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	0.913	0.304	1.67	0.227
Error	12	2.193	0.183		
Total	15	3.106			

S = 0.4275 R-cuad. = 29.40% R-cuad. (ajustado) = 11.75%



Desv.Est. agrupada = 0.4275

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	OWA	N	Media	Agrupación
	7	4	2.6683	A
	21	4	2.5296	A
	14	4	2.4275	A
	1	4	2.0267	A

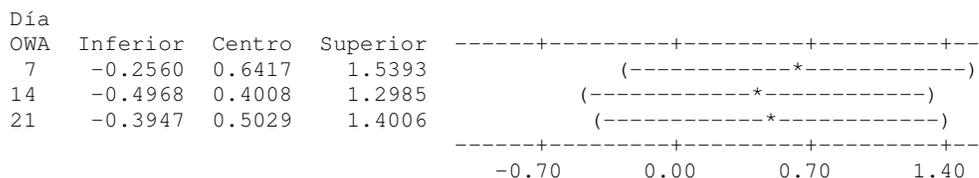
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

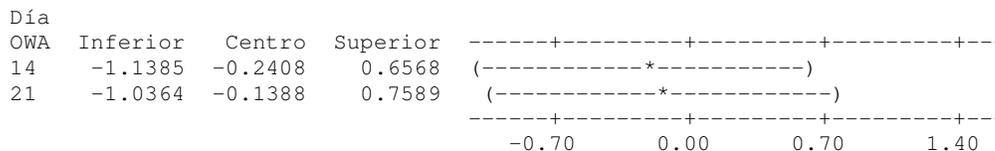
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

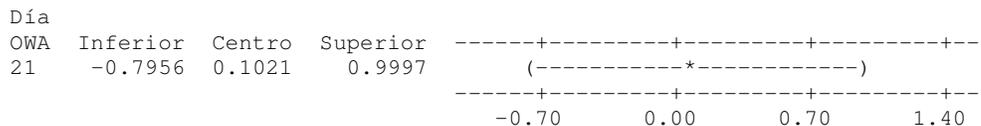
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



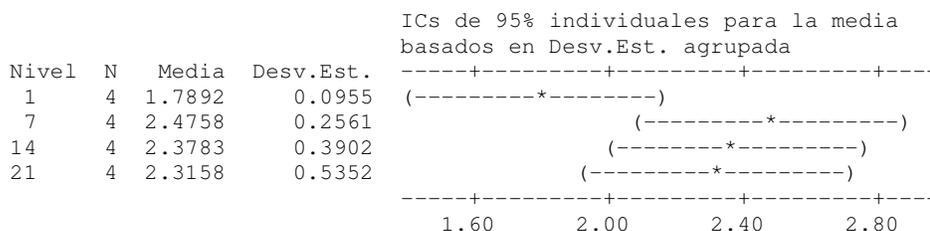
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: a 250 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	1.135	0.378	2.95	0.076
Error	12	1.540	0.128		
Total	15	2.675			

S = 0.3583 R-cuad. = 42.42% R-cuad. (ajustado) = 28.03%



Desv.Est. agrupada = 0.3583

Agrupar información utilizando el método de Tukey

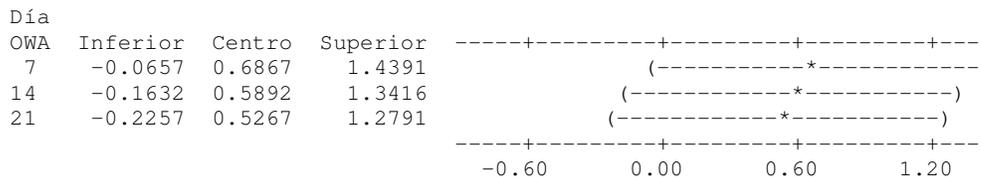
Día	OWA	N	Media	Agrupación
7	4	2.4758	A	
14	4	2.3783	A	
21	4	2.3158	A	
1	4	1.7892	A	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

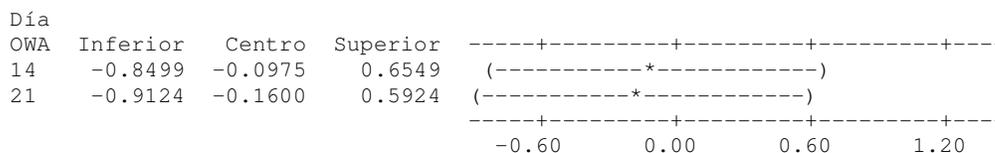
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

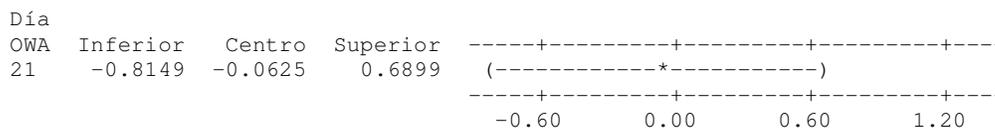
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



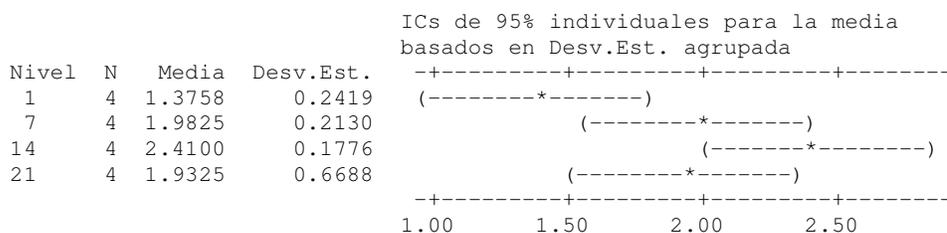
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: a 210 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	2.161	0.720	4.94	0.018
Error	12	1.748	0.146		
Total	15	3.909			

S = 0.3816 R-cuad. = 55.28% R-cuad.(ajustado) = 44.10%



Desv.Est. agrupada = 0.3816

Agrupar información utilizando el método de Tukey

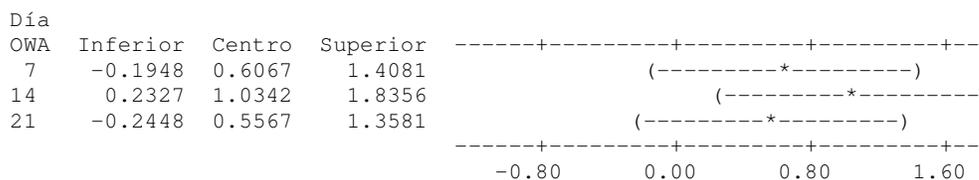
Día	OWA	N	Media	Agrupación
14	4	2.4100	A	
7	4	1.9825	A B	
21	4	1.9325	A B	
1	4	1.3758	B	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

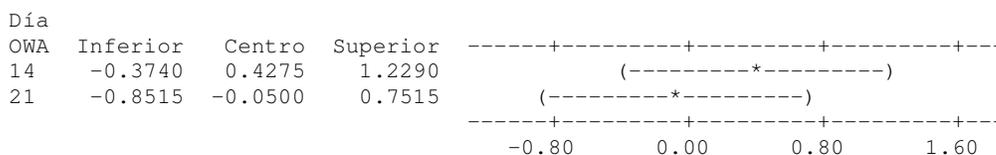
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

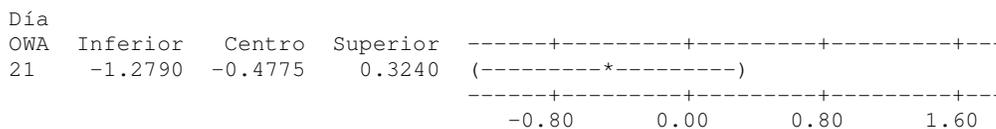
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



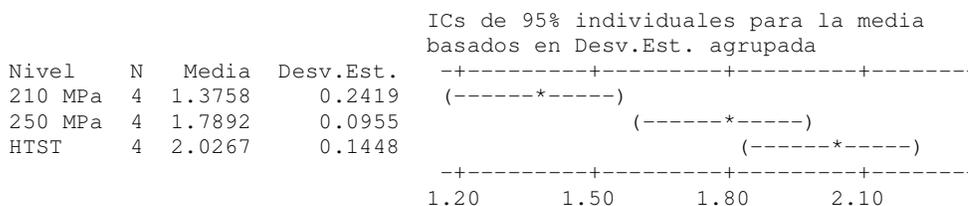
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 1 a vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.8678	0.4339	14.69	0.001
Error	9	0.2658	0.0295		
Total	11	1.1335			

S = 0.1718 R-cuad. = 76.55% R-cuad. (ajustado) = 71.34%



Desv.Est. agrupada = 0.1718

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	2.0267	A
250 MPa	4	1.7892	A
210 MPa	4	1.3758	B

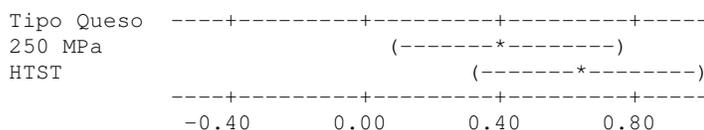
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

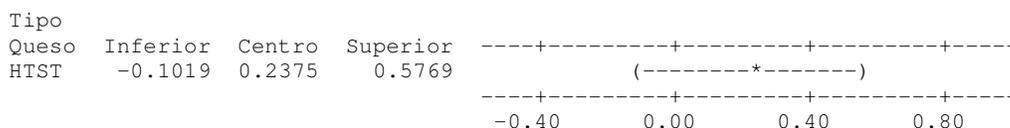
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	0.0739	0.4133	0.7527
HTST	0.3114	0.6508	0.9902



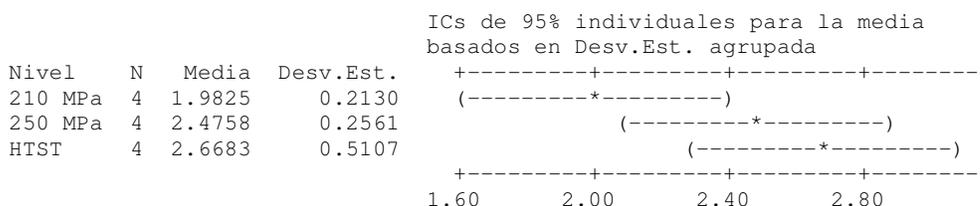
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 7 a vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	1.001	0.501	4.04	0.056
Error	9	1.115	0.124		
Total	11	2.116			

S = 0.3520 R-cuad. = 47.30% R-cuad. (ajustado) = 35.59%



Desv.Est. agrupada = 0.3520

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	2.6683	A
250 MPa	4	2.4758	A
210 MPa	4	1.9825	A

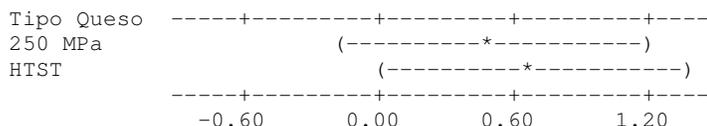
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

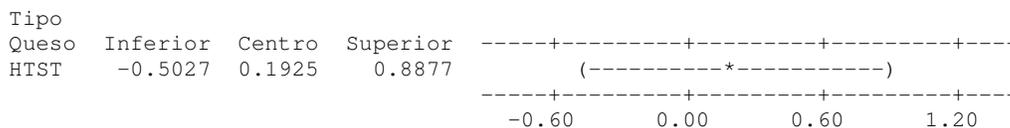
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.2019	0.4933	1.1886
HTST	-0.0094	0.6858	1.3811



Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 14 a vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.005	0.002	0.02	0.979
Error	9	1.064	0.118		
Total	11	1.069			

S = 0.3439 R-cuad. = 0.46% R-cuad. (ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
210 MPa	4	2.4100	0.1776	(-----*-----)
250 MPa	4	2.3783	0.3902	(-----*-----)
HTST	4	2.4275	0.4135	(-----*-----)

2.00 2.25 2.50 2.75

Desv.Est. agrupada = 0.3439

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	2.4275	A
210 MPa	4	2.4100	A
250 MPa	4	2.3783	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.7108	-0.0317	0.6475
HTST	-0.6617	0.0175	0.6967

Tipo Queso	
250 MPa	(-----*-----)
HTST	(-----*-----)

-0.40 0.00 0.40 0.80

Tipo Queso = 250 MPa restado de:

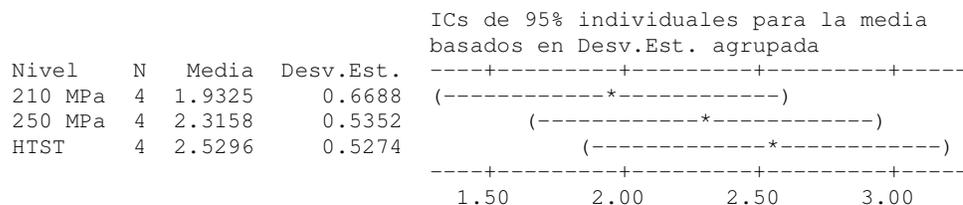
Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior	
HTST	-0.6300	0.0492	0.7283	(-----*-----)

-0.40 0.00 0.40 0.80

ANOVA unidireccional: Dia 21 a vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.732	0.366	1.09	0.378
Error	9	3.036	0.337		
Total	11	3.768			

S = 0.5808 R-cuad. = 19.43% R-cuad. (ajustado) = 1.53%



Desv.Est. agrupada = 0.5808

Agrupar información utilizando el método de Tukey

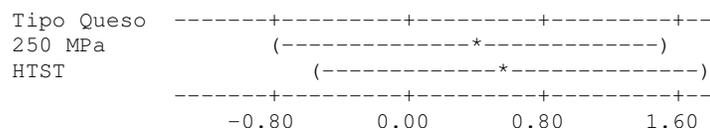
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	2.5296	A
250 MPa	4	2.3158	A
210 MPa	4	1.9325	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso
 Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.7637	0.3833	1.5304
HTST	-0.5499	0.5971	1.7441



Tipo Queso = 250 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	-0.9333	0.2137	1.3608

GG. Análisis de varianza de b de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: b vs. Queso, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210, 250, HTST
Día	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para b, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	4.903	4.903	2.451	1.57	0.221
Día	3	15.317	15.317	5.106	3.28	0.032
Queso*Día	6	11.186	11.186	1.864	1.20	0.330
Error	36	56.085	56.085	1.558		
Total	47	87.490				

S = 1.24817 R-cuad. = 35.90% R-cuad.(ajustado) = 16.31%
 Observaciones inusuales de b

Obs	b	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
19	14.6767	16.9192	0.6241	-2.2425	-2.07 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	16	17.0	A
210	16	16.5	A
250	16	16.2	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	N	Media	Agrupación
7	12	17.1	A
14	12	17.1	A
21	12	16.0	A
1	12	15.9	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

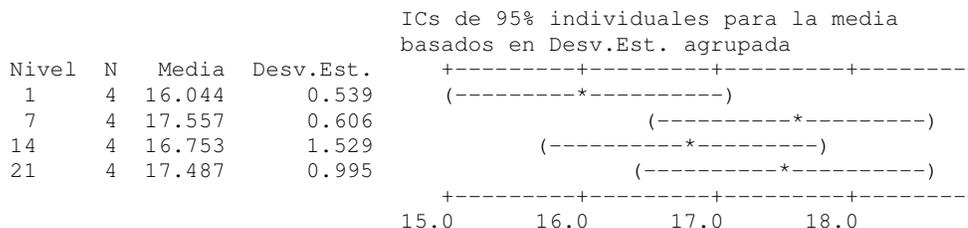
Queso	Día	N	Media	Agrupación
HTST	7	4	17.6	A
HTST	21	4	17.5	A
210	14	4	17.2	A
250	14	4	17.2	A
250	7	4	16.9	A
210	7	4	16.9	A
HTST	14	4	16.8	A
HTST	1	4	16.0	A
210	1	4	15.9	A
210	21	4	15.8	A
250	1	4	15.8	A
250	21	4	14.9	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: b HTST vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	6.069	2.023	2.03	0.164
Error	12	11.962	0.997		
Total	15	18.030			

S = 0.9984 R-cuad. = 33.66% R-cuad. (ajustado) = 17.07%



Desv.Est. agrupada = 0.998
Agrupar información utilizando el método de Tukey

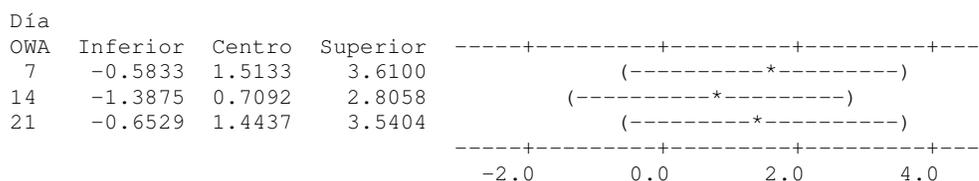
Día	N	Media	Agrupación
7	4	17.5571	A
21	4	17.4875	A
14	4	16.7529	A
1	4	16.0437	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

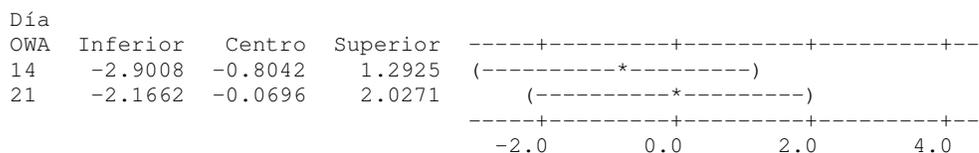
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

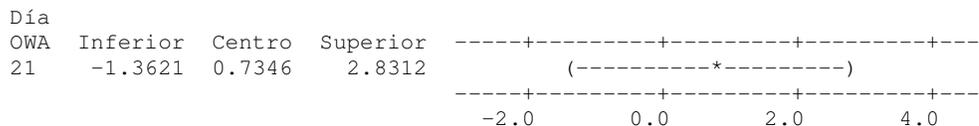
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



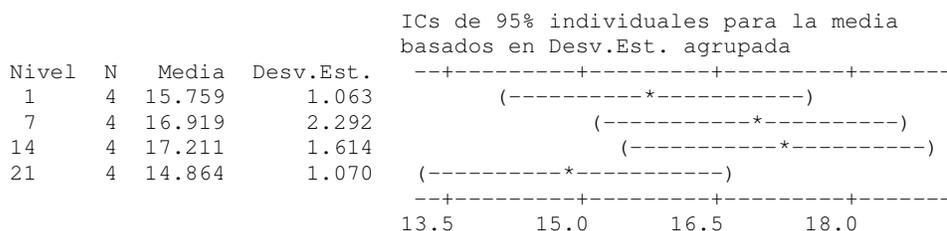
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: b 250 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	14.07	4.69	1.85	0.192
Error	12	30.40	2.53		
Total	15	44.47			

S = 1.592 R-cuad. = 31.64% R-cuad. (ajustado) = 14.55%



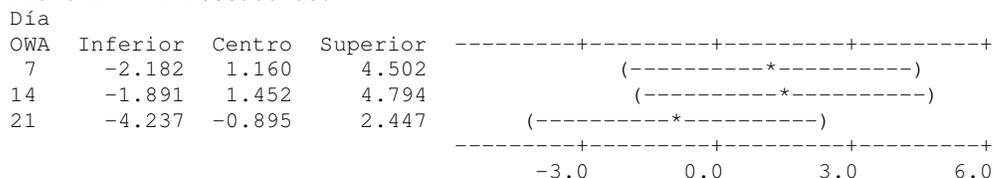
Desv.Est. agrupada = 1.592
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	OWA	N	Media	Agrupación
	14	4	17.211	A
	7	4	16.919	A
	1	4	15.759	A
	21	4	14.864	A

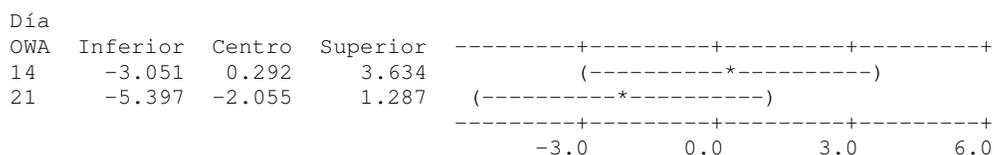
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

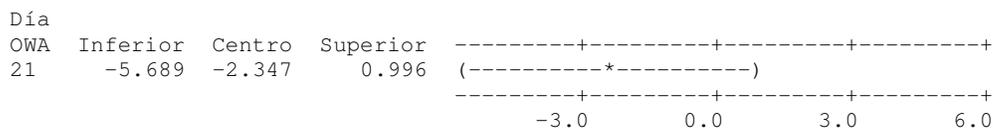
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



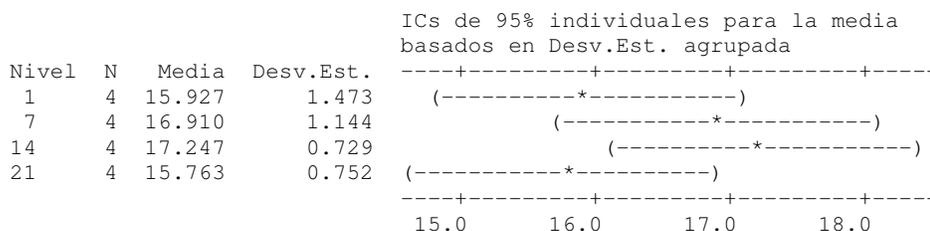
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: b 210 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	6.36	2.12	1.85	0.191
Error	12	13.73	1.14		
Total	15	20.09			

S = 1.070 R-cuad. = 31.68% R-cuad.(ajustado) = 14.60%



Desv.Est. agrupada = 1.070

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	OWA	N	Media	Agrupación
	14	4	17.247	A
	7	4	16.910	A
	1	4	15.927	A
	21	4	15.763	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

Día OWA = 1 restado de:

Día	OWA	Inferior	Centro	Superior
	7	-1.263	0.983	3.229
	14	-0.926	1.320	3.566
	21	-2.409	-0.163	2.083

Día OWA = 7 restado de:

Día	OWA	Inferior	Centro	Superior
	14	-1.909	0.337	2.583
	21	-3.393	-1.147	1.099

Día OWA = 14 restado de:

Día	OWA	Inferior	Centro	Superior
	21	-3.729	-1.483	0.763

ANOVA unidireccional: Día 1 b vs. Tipo Queso

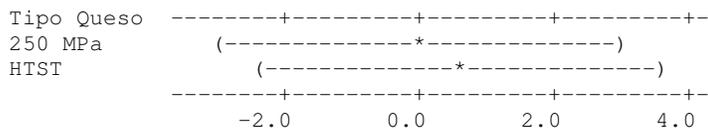
Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.16	0.08	0.07	0.934
Error	9	10.77	1.20		
Total	11	10.93			

S = 1.094 R-cuad. = 1.50% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

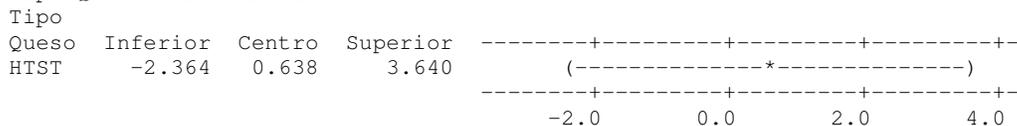
Nivel	N	Media	Desv.Est.
210 MPa	4	15.927	1.473
250 MPa	4	15.759	1.063
HTST	4	16.044	0.539

Desv.Est. agrupada = 1.094
Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-2.993	0.009	3.011
HTST	-2.355	0.647	3.649



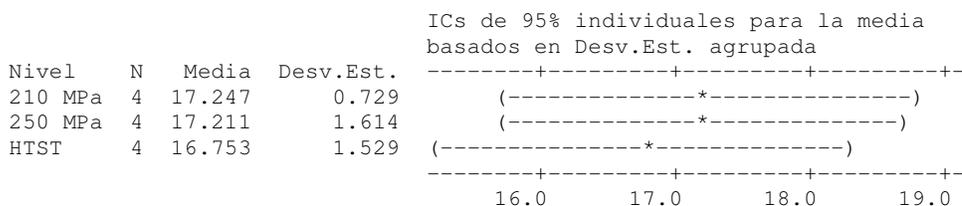
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 14 b vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.61	0.30	0.17	0.850
Error	9	16.43	1.83		
Total	11	17.04			

S = 1.351 R-cuad. = 3.56% R-cuad. (ajustado) = 0.00%



Desv.Est. agrupada = 1.351

Agrupar información utilizando el método de Tukey

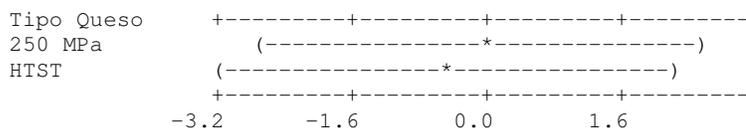
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
210 MPa	4	17.247	A
250 MPa	4	17.211	A
HTST	4	16.753	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

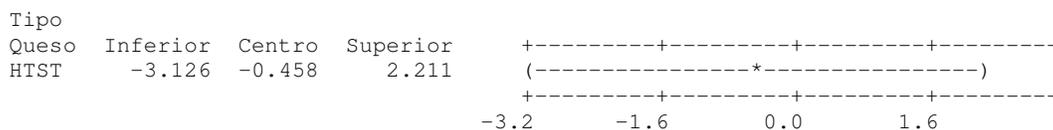
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso
 Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-2.704	-0.036	2.633
HTST	-3.162	-0.494	2.175



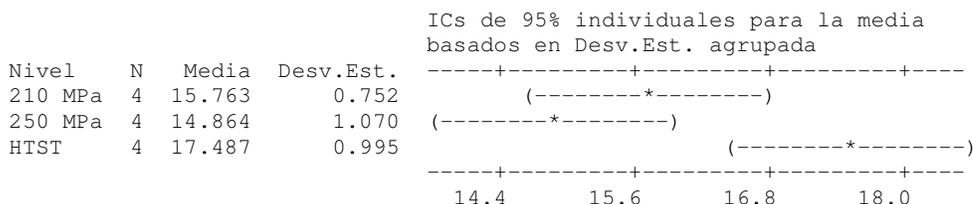
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 21 b vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	14.218	7.109	7.90	0.010
Error	9	8.098	0.900		
Total	11	22.316			

S = 0.9486 R-cuad. = 63.71% R-cuad.(ajustado) = 55.65%



Desv.Est. agrupada = 0.949

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	17.4875	A
210 MPa	4	15.7633	A B
250 MPa	4	14.8642	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

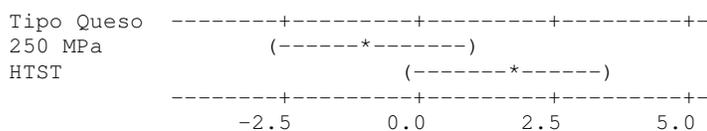
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-2.7726	-0.8992	0.9743
HTST	-0.1493	1.7242	3.5976



Tipo Queso = 250 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	0.7499	2.6233	4.4968

HH. Análisis de varianza de *hue* de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: Hue vs. Queso, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210, 250, HTST
Día	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para Hue, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	0.006064	0.006064	0.003032	1.22	0.306
Día	3	0.007321	0.007321	0.002440	0.98	0.411
Queso*Día	6	0.016546	0.016546	0.002758	1.11	0.374
Error	36	0.089202	0.089202	0.002478		
Total	47	0.119134				

S = 0.0497779 R-cuad. = 25.12% R-cuad.(ajustado) = 2.25%

Observaciones inusuales de Hue

Obs	Hue	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
17	1.14269	1.05258	0.02489	0.09011	2.09 R
18	1.14000	1.05258	0.02489	0.08742	2.03 R
19	0.94693	1.05258	0.02489	-0.10565	-2.45 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
210	16	1.1	A
HTST	16	1.1	A
250	16	1.0	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	N	Media	Agrupación
14	12	1.1	A
7	12	1.1	A
1	12	1.0	A
21	12	1.0	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

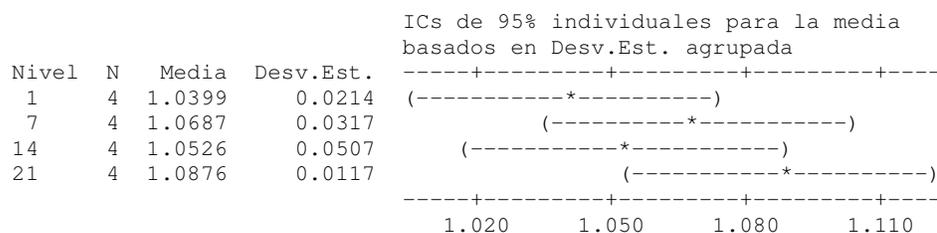
Queso	Día	N	Media	Agrupación
210	14	4	1.1	A
210	7	4	1.1	A
HTST	21	4	1.1	A
250	14	4	1.1	A
HTST	7	4	1.1	A
210	1	4	1.1	A
210	21	4	1.1	A
HTST	14	4	1.1	A
250	7	4	1.1	A
250	1	4	1.0	A
HTST	1	4	1.0	A
250	21	4	1.0	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: Hue HTST vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	0.00509	0.00170	1.63	0.235
Error	12	0.01250	0.00104		
Total	15	0.01759			

S = 0.03227 R-cuad. = 28.95% R-cuad.(ajustado) = 11.19%



Desv.Est. agrupada = 0.0323

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día

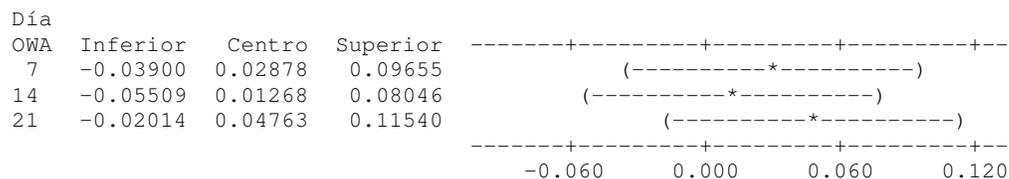
OWA	N	Media	Agrupación
21	4	1.08756	A
7	4	1.06870	A
14	4	1.05261	A
1	4	1.03993	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

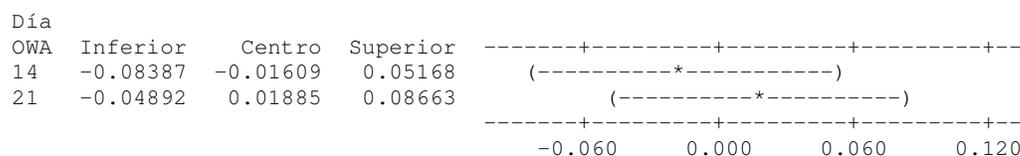
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

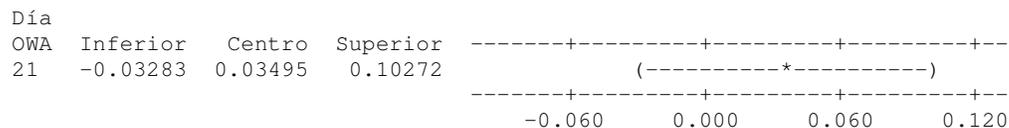
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: Hue 250 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	0.01474	0.00491	1.06	0.404
Error	12	0.05587	0.00466		
Total	15	0.07061			

S = 0.06823 R-cuad. = 20.88% R-cuad.(ajustado) = 1.10%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
1	4	1.0487	0.0563
7	4	1.0526	0.1034
14	4	1.0857	0.0482
21	4	1.0006	0.0493

0.960 1.020 1.080 1.140

Desv.Est. agrupada = 0.0682

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día

OWA	N	Media	Agrupación
14	4	1.08567	A
7	4	1.05258	A
1	4	1.04867	A
21	4	1.00056	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

Día OWA = 1 restado de:

Día

OWA	Inferior	Centro	Superior
7	-0.13938	0.00391	0.14720
14	-0.10630	0.03699	0.18028
21	-0.19140	-0.04811	0.09518

-0.12 0.00 0.12 0.24

Día OWA = 7 restado de:

Día

OWA	Inferior	Centro	Superior
14	-0.11020	0.03309	0.17638
21	-0.19531	-0.05202	0.09127

-0.12 0.00 0.12 0.24

Día OWA = 14 restado de:

Día

OWA	Inferior	Centro	Superior
21	-0.22839	-0.08510	0.05819

-0.12 0.00 0.12 0.24

ANOVA unidireccional: Hue 210 vs. Día

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	0.00403	0.00134	0.77	0.530
Error	12	0.02083	0.00174		
Total	15	0.02487			

S = 0.04167 R-cuad. = 16.22% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
1	4	1.0608	0.0599
7	4	1.0900	0.0432
14	4	1.0902	0.0308
21	4	1.0563	0.0231

1.015 1.050 1.085 1.120

Desv.Est. agrupada = 0.0417

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	N	Media	Agrupación
14	4	1.09024	A
7	4	1.09002	A
1	4	1.06084	A
21	4	1.05626	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

Día OWA = 1 restado de:

Día	Inferior	Centro	Superior	
7	-0.05831	0.02919	0.11669	(-----*-----)
14	-0.05809	0.02941	0.11691	(-----*-----)
21	-0.09207	-0.00457	0.08293	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-0.070 0.000 0.070 0.140

Día OWA = 7 restado de:

Día	Inferior	Centro	Superior	
14	-0.08728	0.00022	0.08772	(-----*-----)
21	-0.12126	-0.03376	0.05374	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-0.070 0.000 0.070 0.140

Día OWA = 14 restado de:

Día	Inferior	Centro	Superior	
21	-0.12148	-0.03398	0.05352	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-0.070 0.000 0.070 0.140

ANOVA unidireccional: Dia 1 H vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.00088	0.00044	0.18	0.836
Error	9	0.02165	0.00241		
Total	11	0.02253			

S = 0.04905 R-cuad. = 3.91% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. Agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
210 MPa	4	1.0608	0.0599	(-----*-----)
250 MPa	4	1.0487	0.0563	(-----*-----)
HTST	4	1.0399	0.0214	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
1.015 1.050 1.085 1.120

Desv.Est. agrupada = 0.0490

Agrupar información utilizando el método de Tukey

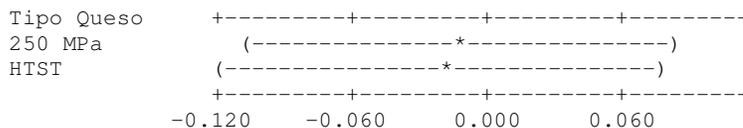
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
210 MPa	4	1.06084	A
250 MPa	4	1.04867	A
HTST	4	1.03993	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso
 Nivel de confianza individual = 97.91%

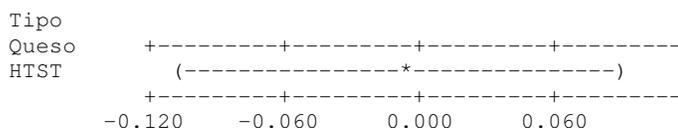
Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.10903	-0.01216	0.08471
HTST	-0.11778	-0.02091	0.07596



Tipo Queso = 250 MPa restado de:

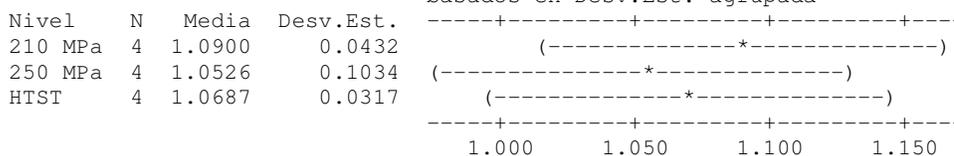
Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	-0.10561	-0.00874	0.08813



ANOVA unidireccional: Dia 7H vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.00282	0.00141	0.31	0.740
Error	9	0.04071	0.00452		
Total	11	0.04353			

S = 0.06725 R-cuad. = 6.48% R-cuad. (ajustado) = 0.00%
 ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada



Desv.Est. agrupada = 0.0673
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

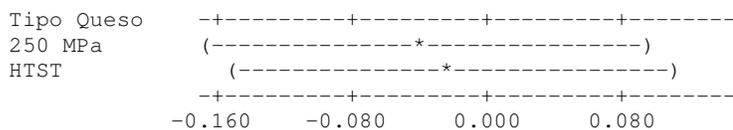
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
210 MPa	4	1.09002	A
HTST	4	1.06870	A
250 MPa	4	1.05258	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

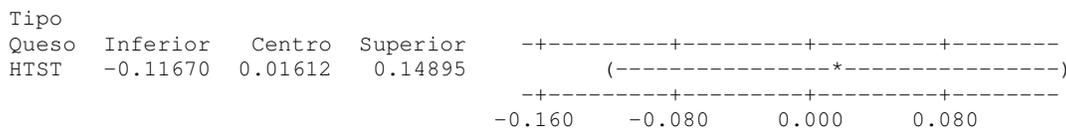
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso
 Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.17027	-0.03744	0.09538
HTST	-0.15415	-0.02132	0.11151



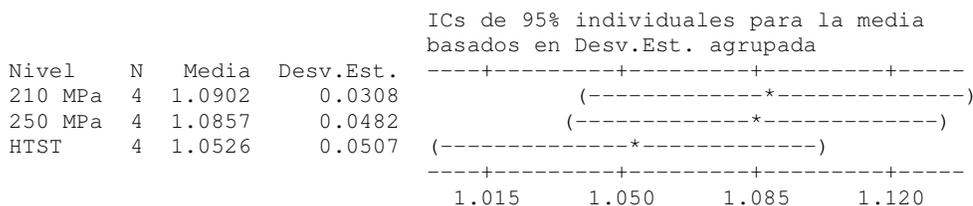
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 14 H vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.00337	0.00169	0.87	0.453
Error	9	0.01753	0.00195		
Total	11	0.02090			

S = 0.04413 R-cuad. = 16.14% R-cuad.(ajustado) = 0.00%



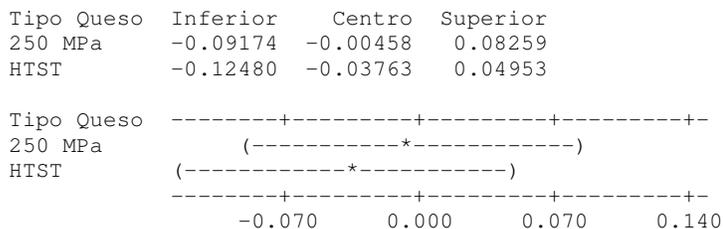
Desv.Est. agrupada = 0.0441
 Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
210 MPa	4	1.09024	A
250 MPa	4	1.08567	A
HTST	4	1.05261	A

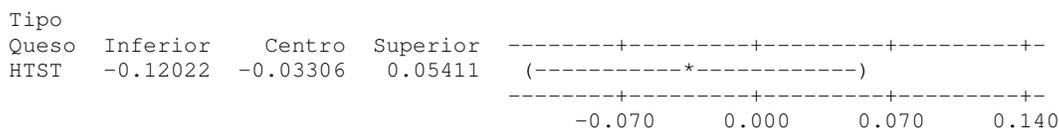
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso
 Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:



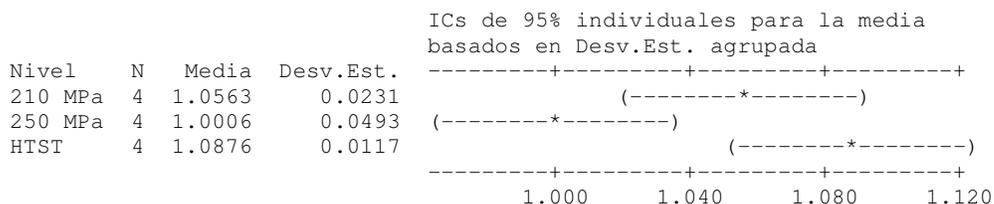
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Día 21H vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	0.01553	0.00777	7.51	0.012
Error	9	0.00931	0.00103		
Total	11	0.02485			

S = 0.03217 R-cuad. = 62.52% R-cuad.(ajustado) = 54.19%



Desv.Est. agrupada = 0.0322

Agrupar información utilizando el método de Tukey

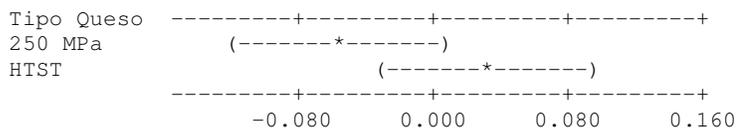
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	1.08756	A
210 MPa	4	1.05626	A B
250 MPa	4	1.00056	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

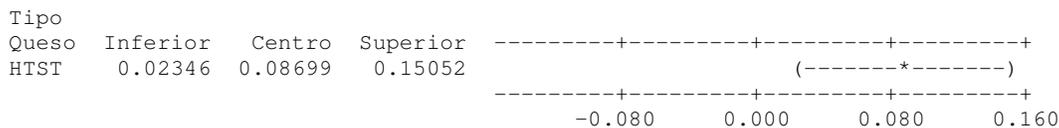
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-0.11923	-0.05570	0.00783
HTST	-0.03224	0.03129	0.09482



Tipo Queso = 250 MPa restado de:



II. Análisis de varianza de *cromaticidad* de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: Cromaticidad vs. Queso, Día

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Queso	fijo	3	210, 250, HTST
Día	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para Cromacidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Queso	2	5.476	5.476	2.738	1.18	0.318
Día	3	30.505	30.505	10.168	4.40	0.010
Queso*Día	6	15.378	15.378	2.563	1.11	0.377
Error	36	83.223	83.223	2.312		
Total	47	134.583				

S = 1.52044 R-cuad. = 38.16% R-cuad.(ajustado) = 19.27%

Observaciones inusuales de Cromacidad

Obs	Cromaticidad	EE de Ajuste	Residuo estandar
28	18.1158	15.3481	0.7602 2.7677 2.10 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Queso	N	Media	Agrupación
HTST	16	15.5	A
210	16	14.8	A
250	16	14.8	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	N	Media	Agrupación
14	12	15.9	A
7	12	15.7	A
21	12	14.7	A B
1	12	13.9	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

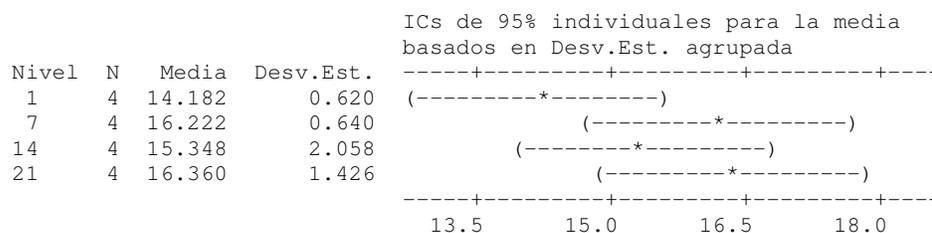
Queso	Día	N	Media	Agrupación
HTST	21	4	16.4	A
HTST	7	4	16.2	A
210	14	4	16.1	A
250	14	4	16.1	A
250	7	4	15.6	A
210	7	4	15.4	A
HTST	14	4	15.3	A
HTST	1	4	14.2	A
210	21	4	14.2	A
250	1	4	13.9	A
210	1	4	13.6	A
250	21	4	13.6	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: C* HTST vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	12.07	4.02	2.28	0.132
Error	12	21.19	1.77		
Total	15	33.27			

S = 1.329 R-cuad. = 36.30% R-cuad.(ajustado) = 20.37%



Desv.Est. agrupada = 1.329

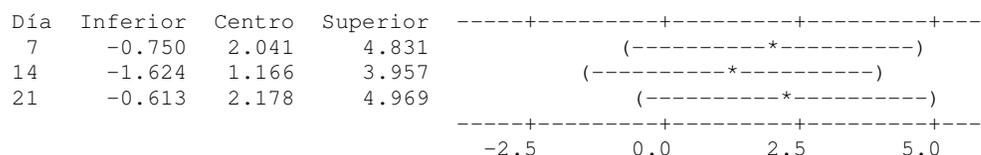
Agrupar información utilizando el método de Tukey

Día	N	Media	Agrupación
21	4	16.360	A
7	4	16.222	A
14	4	15.348	A
1	4	14.182	A

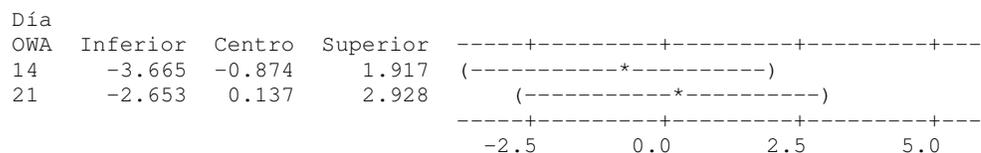
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

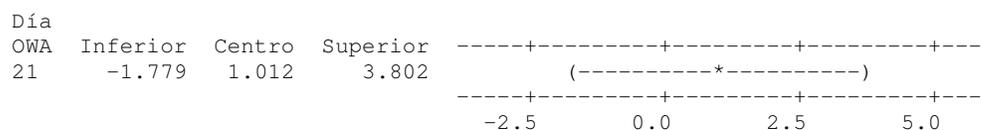
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



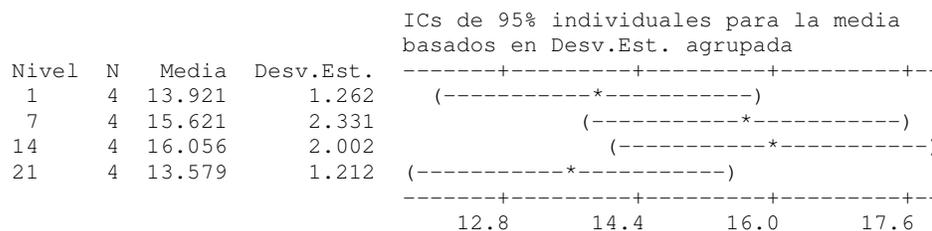
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: C* 250 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	18.06	6.02	1.93	0.179
Error	12	37.52	3.13		
Total	15	55.58			

S = 1.768 R-cuad. = 32.50% R-cuad. (ajustado) = 15.62%



Desv.Est. agrupada = 1.768

Agrupar información utilizando el método de Tukey

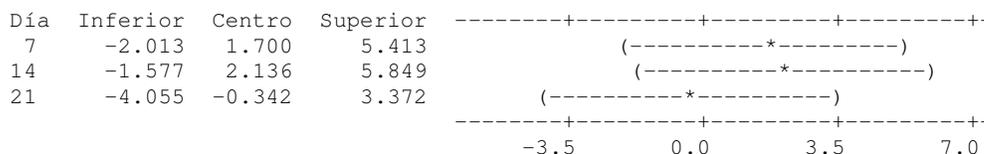
Día	N	Media	Agrupación
14	4	16.056	A
7	4	15.621	A
1	4	13.921	A
21	4	13.579	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

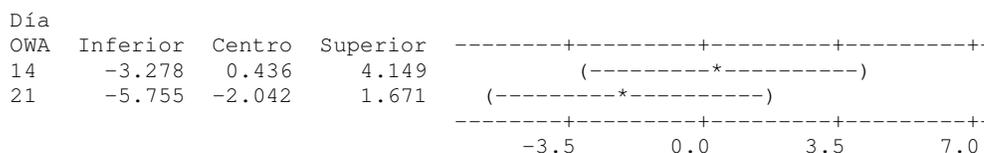
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Día OWA

Nivel de confianza individual = 98.83%

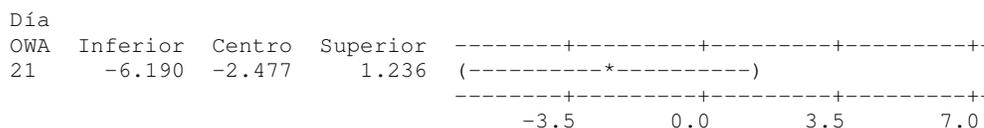
Día OWA = 1 restado de:



Día OWA = 7 restado de:



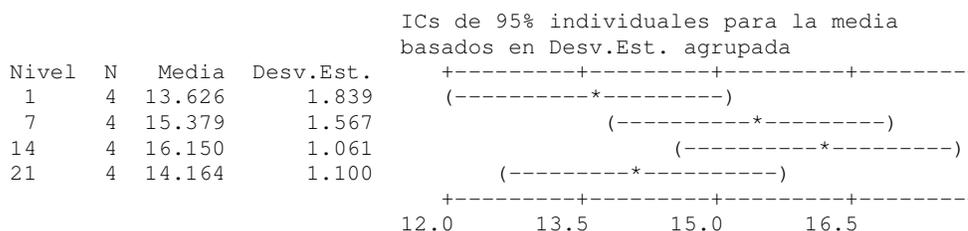
Día OWA = 14 restado de:



ANOVA unidireccional: C* 210 vs. Día OWA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Día OWA	3	15.75	5.25	2.57	0.103
Error	12	24.51	2.04		
Total	15	40.26			

S = 1.429 R-cuad. = 39.11% R-cuad. (ajustado) = 23.89%



Agrupar información utilizando el método de Tukey

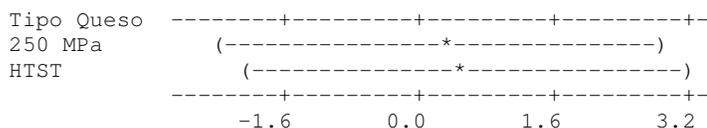
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	14.182	A
250 MPa	4	13.921	A
210 MPa	4	13.626	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

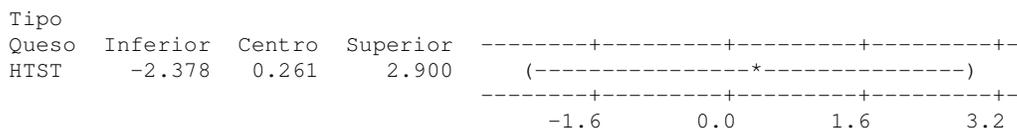
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

Nivel de confianza individual = 97.91%
 Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-2.345	0.295	2.934
HTST	-2.084	0.556	3.195



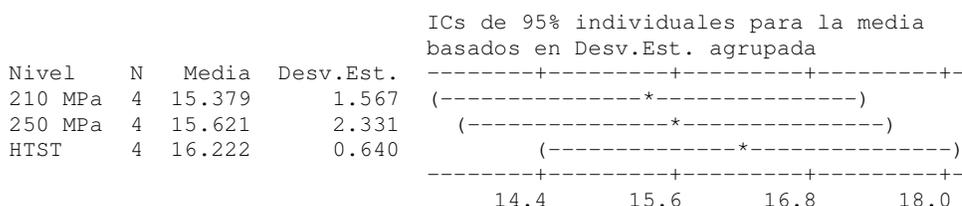
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 7 C vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	1.51	0.75	0.27	0.768
Error	9	24.90	2.77		
Total	11	26.41			

S = 1.663 R-cuad. = 5.71% R-cuad.(ajustado) = 0.00%



Desv.Est. agrupada = 1.663

Agrupar información utilizando el método de Tukey

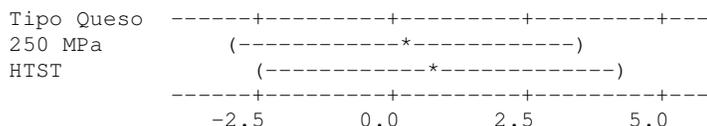
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	16.222	A
250 MPa	4	15.621	A
210 MPa	4	15.379	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

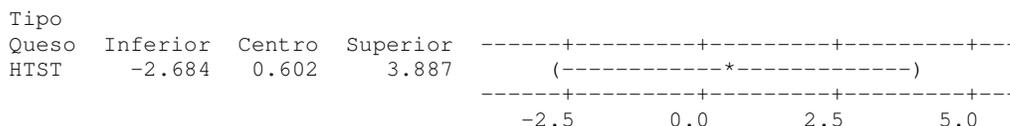
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso
 Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-3.044	0.241	3.527
HTST	-2.442	0.843	4.128



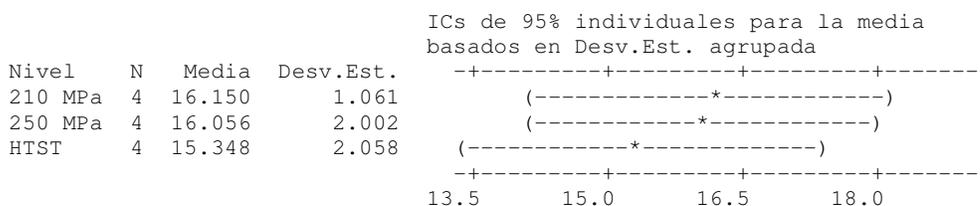
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Dia 14 C vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	1.54	0.77	0.25	0.787
Error	9	28.11	3.12		
Total	11	29.65			

S = 1.767 R-cuad. = 5.19% R-cuad. (ajustado) = 0.00%



Desv.Est. agrupada = 1.767

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tipo Queso	N	Media	Agrupación
210 MPa	4	16.150	A
250 MPa	4	16.056	A
HTST	4	15.348	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

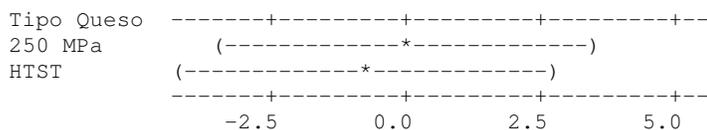
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

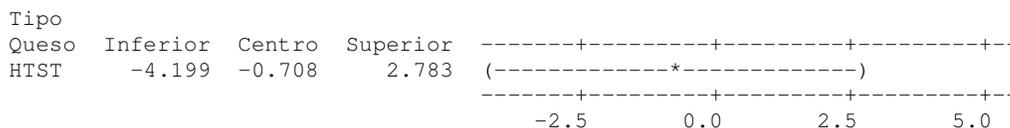
Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-3.584	-0.094	3.397
HTST	-4.293	-0.802	2.689



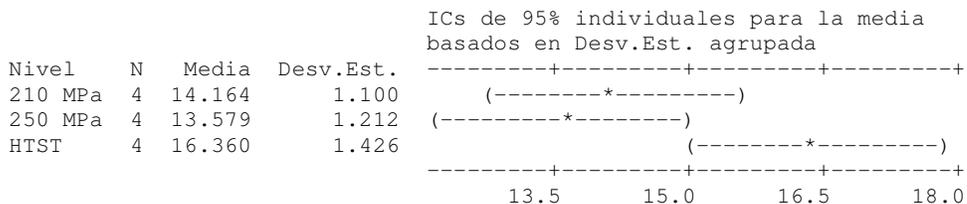
Tipo Queso = 250 MPa restado de:



ANOVA unidireccional: Día 21 C vs. Tipo Queso

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tipo Queso	2	17.1	8.60	5.47	0.028
Error	9	14.13	1.57		
Total	11	31.32			

S = 1.253 R-cuad. = 54.88% R-cuad.(ajustado) = 44.85%



Desv.Est. agrupada = 1.253

Agrupar información utilizando el método de Tukey

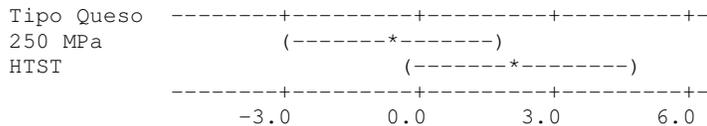
Tipo Queso	N	Media	Agrupación
HTST	4	16.360	A
210 MPa	4	14.164	A B
250 MPa	4	13.579	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95% Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tipo Queso

Nivel de confianza individual = 97.91%

Tipo Queso = 210 MPa restado de:

Tipo Queso	Inferior	Centro	Superior
250 MPa	-3.060	-0.585	1.890
HTST	-0.280	2.195	4.670



Tipo Queso = 250 MPa restado de:

Tipo

Queso	Inferior	Centro	Superior
HTST	0.306	2.781	5.255

JJ. Análisis de varianza de *cromaticidad* de quesos HAP vs HTST durante el almacenamiento refrigerado

Modelo lineal general: DE vs. Qso DE, Día DE

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Qso DE	fijo	2	210, 250
Día DE	fijo	4	1, 7, 14, 21

Análisis de varianza para DE, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Qso DE	1	0.997	0.997	0.997	0.96	0.338
Día DE	3	5.017	5.017	1.672	1.60	0.215
Qso DE*Día DE	3	3.089	3.089	1.030	0.99	0.416
Error	24	25.040	25.040	1.043		
Total	31	34.143				

S = 1.02144 R-cuad. = 26.66% R-cuad.(ajustado) = 5.27%
 Observaciones inusuales de DE

Obs	DE	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
29	5.70366	3.74779	0.51072	1.95586	2.21 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Qso	DE	N	Media	Agrupación
250	16	2.7	A	
210	16	2.4	A	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
 Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Día	DE	N	Media	Agrupación
21	8	3.1	A	
7	8	2.6	A	
14	8	2.4	A	
1	8	2.0	A	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Qso	DE	Día DE	N	Media	Agrupación
250	21	4	3.7	A	
250	7	4	2.9	A	
210	21	4	2.5	A	
250	14	4	2.4	A	
210	7	4	2.4	A	
210	14	4	2.4	A	
210	1	4	2.2	A	
250	1	4	1.8	A	

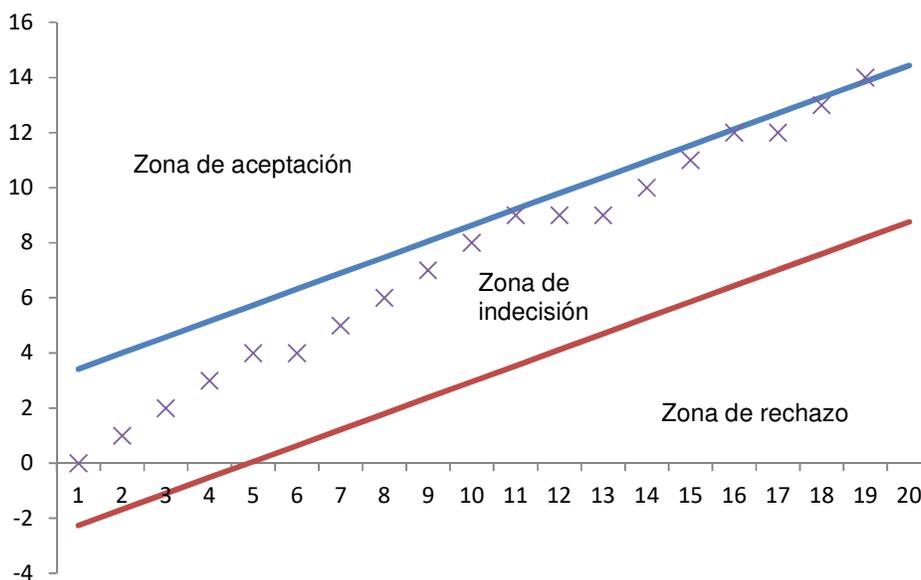
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Sección 4.5

KK. Ejemplo de análisis secuencial para seleccionar panelistas

Nombre: Rossana Aguilar Macías

Número de ensayos	L0:d0	L1:d1	Valor acumulativo
1	-2.26	3.42	0
2	-1.68	4	1
3	-1.1	4.58	2
4	-0.52	5.16	3
5	0.06	5.74	4
6	0.64	6.32	4
7	1.22	6.9	5
8	1.8	7.48	6
9	2.38	8.06	7
10	2.96	8.64	8
11	3.54	9.22	9
12	4.12	9.8	9
13	4.7	10.38	9
14	5.28	10.96	10
15	5.86	11.54	11
16	6.44	12.12	12
17	7.02	12.7	12
18	7.6	13.28	13
19	8.18	13.86	14
20	8.76	14.44	



LL. Análisis de componentes principales de gustos para leches HTST y tratada por PM de HAP

XLSTAT 7.5.2 - Análisis de Componentes Principales (ACP) - el 26/07/2011 a 11:04:30 p.m.

Tabla: libro = PCA for milk .xlsx / hoja = Gustos / rango = \$E\$60:\$U\$62 / 3 filas y 17 columnas

Ponderación uniforme (predeterminado) Ningún dato omitido detectado

Covarianza (ACP no normalizado, varianzas en 1/(n-1))

Sin rotación de los ejes

Número de factores asociados a valores propios no triviales: 2

Media y desviación típica de las columnas:

	Media	Desviación típica
Agrio	8.229	14.253
Amargo	20.938	8.119
Astringente	25.104	9.219
Crema ácida	15.313	12.990
Crema para batir	33.021	2.658
Dulce	18.750	5.163
Fermentado	13.021	4.681
Leche cocida	33.229	2.127
Metálico	26.354	9.465
Oxidado	26.042	9.145
Plástico	24.271	4.691
Procesado	32.396	16.611
Queso crema	31.354	2.387
Queso fresco	33.333	5.138
Suero	25.000	5.703
Yogurt	20.938	4.667
Jabon	17.604	30.491

Vectores propios:

	F1	F2
Agrio	0.351	0.102
Amargo	0.200	0.058
Astringente	-0.115	0.370
Crema ácida	0.203	-0.470
Crema para batir	-0.008	0.122
Dulce	0.057	0.215
Fermentado	-0.106	-0.089
Leche cocida	-0.023	0.089
Metálico	0.227	0.124
Oxidado	0.228	0.029
Plástico	0.111	-0.071
Procesado	-0.272	0.582
Queso crema	0.002	0.111
Queso fresco	0.067	0.203
Suero	-0.062	-0.238
Yogurt	-0.060	-0.186
Jabon	0.752	0.217

Coordenadas de las variables:

	F1	F2
Agrio	14.084	2.191
Amargo	8.023	1.248
Astringente	-4.619	7.979
Crema ácida	8.147	-10.118
Crema para batir	-0.319	2.639
Dulce	2.293	4.626
Fermentado	-4.265	-1.928
Leche cocida	-0.936	1.910
Metálico	9.078	2.677
Oxidado	9.123	0.628
Plástico	4.437	-1.524
Procesado	-10.897	12.537
Queso crema	0.085	2.385
Queso fresco	2.698	4.373
Suero	-2.489	-5.131
Yogurt	-2.389	-4.009
Jabon	30.129	4.687

Correlaciones de las variables con los factores:

	F1	F2
Agrio	0.988	0.154
Amargo	0.988	0.154
Astringente	-0.501	0.865
Crema ácida	0.627	-0.779
Crema para batir	-0.120	0.993
Dulce	0.444	0.896
Fermentado	-0.911	-0.412
Leche cocida	-0.440	0.898
Metálico	0.959	0.283

Oxidado	0.998	0.069
Plástico	0.946	-0.325
Procesado	-0.656	0.755
Queso crema	0.036	0.999
Queso fresco	0.525	0.851
Suero	-0.436	-0.900
Yogurt	-0.512	-0.859
Jabon	0.988	0.154

Cosenos cuadrados de las variables:

	F1	F2
Agrio	0.976	0.024
Amargo	0.976	0.024
Astringente	0.251	0.749
Crema ácida	0.393	0.607
Crema para batir	0.014	0.986
Dulce	0.197	0.803
Fermentado	0.830	0.170
Leche cocida	0.194	0.806
Metálico	0.920	0.080
Oxidado	0.995	0.005
Plástico	0.894	0.106
Procesado	0.430	0.570
Queso crema	0.001	0.999
Queso fresco	0.276	0.724
Suero	0.190	0.810
Yogurt	0.262	0.738
Jabon	0.976	0.024

Contribuciones de las variables (%):

	F1	F2
Agrio	12.352	1.034
Amargo	4.008	0.335
Astringente	1.329	13.709
Crema ácida	4.133	22.047
Crema para batir	0.006	1.499
Dulce	0.327	4.609
Fermentado	1.133	0.801
Leche cocida	0.055	0.786
Metálico	5.132	1.544
Oxidado	5.183	0.085
Plástico	1.226	0.500
Procesado	7.395	33.847
Queso crema	0.000	1.225
Queso fresco	0.453	4.118
Suero	0.386	5.670
Yogurt	0.355	3.461
Jabon	56.527	4.730

Coordenadas de las observaciones:

	F1	F2
Milk 210 5R	45.723	3.824
Milk 250 4R	-29.021	19.380
Pasteurized Milk	-16.702	-23.205

Cosenos cuadrados de las observaciones:

	F1	F2
Milk 210 5R	0.993	0.007
Milk 250 4R	0.692	0.308
Pasteurized Milk	0.341	0.659

Contribuciones de las observaciones (%):

	F1	F2
Milk 210 5R	65.092	1.575
Milk 250 4R	26.223	40.444
Pasteurized Milk	8.685	57.981

MM. Análisis de componentes principales de aroma para leches HTST y tratada por PM de HAP

XLSTAT 7.5.2 - Análisis de Componentes Principales (ACP) - el 26/07/2011 a 11:06:44 p.m.

Tabla: libro = PCA for milk .xlsx / hoja = Aromas / rango

Ponderación uniforme (predeterminado)

Ningún dato omitido detectado

Covarianza (ACP no normalizado, varianzas en 1/(n-1))

Sin rotación de los ejes

Número de factores asociados a valores propios no triviales: 2

Media y desviación típica de las columnas:

	Media	Desviación típica
Cartón	22.917	14.565
Grasa butírica	18.646	3.622
Leche en polvo	34.375	2.981
Leche evaporada	31.771	0.180
Leche quemada	10.833	10.352
Malta	25.729	3.456
Media crema	28.646	5.558
Petit Suisse	6.146	10.645
Queso parmesano	19.167	21.161
Refrigerador	27.500	8.683
Vainilla	2.604	4.511

Valores propios:

	F1	F2
Valor propio	838.366	202.649
% varianza	80.533	19.467
% acumulado	80.533	100.000

Número de valores propios triviales suprimidos: 9

Vectores propios:

	F1	F2
Cartón	0.497	-0.156
Grasa butírica	0.119	-0.079
Leche en polvo	0.068	-0.156
Leche evaporada	0.004	0.009
Leche quemada	0.332	0.271
Malta	-0.078	0.183
Media crema	0.009	0.390
Petit Suisse	-0.107	0.715
Queso parmesano	0.723	0.222
Refrigerador	-0.286	0.180
Vainilla	-0.045	0.303

Coordenadas de las variables:

	F1	F2
Cartón	14.395	-2.223
Grasa butírica	3.444	-1.121
Leche en polvo	1.983	-2.226
Leche evaporada	0.123	0.132
Leche quemada	9.604	3.864
Malta	-2.264	2.612
Media crema	0.271	5.551
Petit Suisse	-3.097	10.184
Queso parmesano	20.924	3.158
Refrigerador	-8.294	2.569
Vainilla	-1.312	4.315

Correlaciones de las variables con los factores:

	F1	F2
Cartón	0.988	-0.153
Grasa butírica	0.951	-0.310
Leche en polvo	0.665	-0.747
Leche evaporada	0.683	0.730
Leche quemada	0.928	0.373
Malta	-0.655	0.756
Media crema	0.049	0.999
Petit Suisse	-0.291	0.957
Queso parmesano	0.989	0.149
Refrigerador	-0.955	0.296
Vainilla	-0.291	0.957

Cosenos cuadrados de las variables:

	F1	F2
Cartón	0.977	0.023
Grasa butírica	0.904	0.096
Leche en polvo	0.443	0.557
Leche evaporada	0.467	0.533
Leche quemada	0.861	0.139
Malta	0.429	0.571
Media crema	0.002	0.998
Petit Suisse	0.085	0.915
Queso parmesano	0.978	0.022
Refrigerador	0.912	0.088
Vainilla	0.085	0.915

Contribuciones de las variables (%):

	F1	F2
Cartón	24.715	2.438
Grasa butírica	1.415	0.620
Leche en polvo	0.469	2.444
Leche evaporada	0.002	0.009
Leche quemada	11.002	7.366
Malta	0.611	3.366
Media crema	0.009	15.208
Petit Suisse	1.144	51.182
Queso parmesano	52.223	4.920
Refrigerador	8.205	3.258
Vainilla	0.205	9.190

Coordenadas de las observaciones:

	F1	F2
Milk 210 5R	32.566	-3.721
Milk 250 4R	-9.728	15.727
Pasteurized Milk	-22.838	-12.005

Cosenos cuadrados de las observaciones:

	F1	F2
Milk 210 5R	0.987	0.013
Milk 250 4R	0.277	0.723
Pasteurized Milk	0.783	0.217

Contribuciones de las observaciones (%):

	F1	F2
Milk 210 5R	63.250	3.417
Milk 250 4R	5.644	61.023
Pasteurized Milk	31.106	35.561

NN. Análisis de componentes principales de sensación bucal para leches HTST y tratada por PM de HAP

XLSTAT 7.5.2 - Análisis de Componentes Principales (ACP) - el 26/07/2011 a 11:08:25 p.m.
 Tabla: libro = PCA for milk .xlsx / hoja = Textura / rango = \$E\$59:\$F\$61 / 3 filas y 2 columnas
 Ponderación uniforme (predeterminado)
 Ningún dato omitido detectado
 Covarianza (ACP no normalizado, varianzas en 1/(n-1))
 Sin rotación de los ejes
 Número de factores asociados a valores propios no triviales: 2

Prueba de esfericidad de Bartlett (basado en las covarianzas):

Chi-cuadrado (valor observado)	1.812
Chi-cuadrado (valor crítico)	5.991
GDL	2
p-value unilateral	0.404
Alpha	0.05

Prueba de esfericidad de Bartlett (basado en las correlaciones):

Chi-cuadrado (valor observado)	0.153
Chi-cuadrado (valor crítico)	3.841
GDL	1
p-value unilateral	0.696
Alpha	0.05

Media y desviación típica de las columnas:

	Media	Desviación típica
Creamy mouthfeel	16.771	7.858
Oily mouthfeel	13.958	4.489

Matriz de covarianza:

	Creamy mouthfeel	Oily mouthfeel
Creamy mouthfeel	61.751	18.099
Oily mouthfeel	18.099	20.150

Valores propios:

	F1	F2
Valor propio	68.523	13.378
% varianza	83.666	16.334
% acumulado	83.666	100.000

Vectores propios:

	F1	F2
Creamy mouthfeel	0.937	-0.350
Oily mouthfeel	0.350	0.937

Coordenadas de las variables:

	F1	F2
Creamy mouthfeel	7.753	-1.282
Oily mouthfeel	2.901	3.426

Correlaciones de las variables con los factores:

	F1	F2
Creamy mouthfeel	0.987	-0.163
Oily mouthfeel	0.646	0.763

Cosenos cuadrados de las variables:

	F1	F2
Creamy mouthfeel	0.973	0.027
Oily mouthfeel	0.418	0.582

Contribuciones de las variables (%):

	F1	F2
Creamy mouthfeel	87.720	12.280
Oily mouthfeel	12.280	87.720

Coordenadas de las observaciones:

	F1	F2
Milk 210 5R	4.745	-3.666
Milk 250 4R	-9.558	0.017
Pasteurized Milk	4.813	3.649

Cosenos cuadrados de las observaciones:

	F1	F2
Milk 210 5R	0.626	0.374
Milk 250 4R	1.000	0.000
Pasteurized Milk	0.635	0.365

Contribuciones de las observaciones (%):

	F1	F2
Milk 210 5R	16.431	50.236
Milk 250 4R	66.666	0.001
Pasteurized Milk	16.903	49.763

OO. Análisis de componentes principales de gustos de quesos panela elaborados con leches HTST y tratada por PM de HAP

XLSTAT 7.5.2 - Análisis de Componentes Principales (ACP) - el 28/07/2011 a 12:08:07 a.m.

Tabla: libro = Analisis Quesos PCA.xls / hoja = Aromas / rango = \$D\$58:\$J\$60 / 3 filas y 7 columnas

Ponderación uniforme (predeterminado)

Ningún dato omitido detectado

Covarianza (ACP no normalizado, varianzas en 1/(n-1))

Sin rotación de los ejes

Número de factores asociados a valores propios no triviales: 2

Media y desviación típica de las columnas:

	Media	Desviación típica
Mantequilla	7.857	13.609
Establo	27.976	20.924
Leche cruda	32.619	5.301
Parmesano	18.214	21.402
Queso Fresco	46.548	7.795
Queso Cartón	7.619	9.212
Queso añejo	7.500	7.685

Matriz de covarianza:

	Mantequilla	Establo	Leche cruda	Parmesano	Queso Fresco	Cartón	Queso añejo
Mantequilla	185.204	238.520	-68.750	277.806	-81.378	-30.867	92.602
Establo	238.520	437.798	-70.174	431.250	-47.662	62.287	78.444
Leche cruda	-68.750	-70.174	28.104	-92.793	38.244	25.808	-40.115
Parmesano	277.806	431.250	-92.793	458.036	-89.923	11.097	115.944
Queso Fresco	-81.378	-47.662	38.244	-89.923	60.757	58.206	-58.546
Queso Cartón	-30.867	62.287	25.808	11.097	58.206	84.864	-47.321
Queso añejo	92.602	78.444	-40.115	115.944	-58.546	-47.321	59.056

Valores propios:

	F1	F2
Valor propio	1098.661	215.157
% varianza	83.623	16.377
% acumulado	83.623	100.000

Número de valores propios triviales suprimidos: 5

Vectores propios:

	F1	F2
Mantequilla	0.392	-0.274
Establo	0.607	0.392
Leche cruda	-0.131	0.206
Parmesano	0.646	0.008
Queso Fresco	-0.128	0.446
Queso Cartón	0.014	0.627
Queso añejo	0.164	-0.369

Coordenadas de las variables:

	F1	F2
Mantequilla	13.004	-4.013
Establo	20.118	5.752
Leche cruda	-4.353	3.025
Parmesano	21.401	0.123
Queso Fresco	-4.239	6.541
Cartón	0.466	9.200
Queso añejo	5.449	-5.419

Correlaciones de las variables con los factores:

	F1	F2
Mantequilla	0.956	-0.295
Establo	0.961	0.275
Leche cruda	-0.821	0.571
Parmesano	1.000	0.006
Queso Fresco	-0.544	0.839
Cartón	0.051	0.999
Queso añejo	0.709	-0.705

Cosenos cuadrados de las variables:

	F1	F2
Mantequilla	0.913	0.087
Establo	0.924	0.076
Leche cruda	0.674	0.326
Parmesano	1.000	0.000
Queso Fresco	0.296	0.704
Cartón	0.003	0.997
Queso añejo	0.503	0.497

Contribuciones de las variables (%):

	F1	F2
Mantequilla	15.391	7.486
Establo	36.837	15.375
Leche cruda	1.725	4.254
Parmesano	41.689	0.007
Queso Fresco	1.636	19.886
Cartón	0.020	39.342
Queso añejo	2.702	13.650

Coordenadas de las observaciones:

	F1	F2
Cheese 210	36.572	-4.995
Cheese 250	-28.061	-11.518
Cheese HTST	-8.511	16.513

Cosenos cuadrados de las observaciones:

	F1	F2
Cheese 210	0.982	0.018
Cheese 250	0.856	0.144
Cheese HTST	0.210	0.790

Contribuciones de las observaciones (%):

	F1	F2
Cheese 210	60.869	5.798
Cheese 250	35.835	30.832
Cheese HTST	3.296	63.370

PP. Análisis de componentes principales de gustos de quesos panela elaborados con leches HTST y tratada por PM de HAP

XLSTAT 7.5.2 - Análisis de Componentes Principales (ACP) - el 28/07/2011 a 12:10:26 a.m.

Tabla: libro = Analisis Quesos PCA.xls / hoja = Gustos / rango = \$D\$57:\$T\$59 / 3 filas y 17 columnas

Ponderación uniforme (predeterminado)

Ningún dato omitido detectado

Covarianza (ACP no normalizado, varianzas en 1/(n-1))

Sin rotación de los ejes

Número de factores asociados a valores propios no triviales: 2

Media y desviación típica de las columnas:

	Media	Desviación típica
Suero	17.738	7.844
Salado	36.667	7.155
Dulce	10.595	2.774
Amargo	14.524	14.727
Jabón	25.476	19.214
Crema ácida	17.024	21.418
Levadura	10.000	13.229
Procesado	18.333	23.629
Queso Fresco	46.548	7.795
Oxidado	9.881	13.298
Leche cortada / PCL	15.833	19.419
Leche en polvo	10.833	5.894
Crema	24.167	9.108
Metálico	14.167	20.361
Fermentado	12.500	7.328
Queso crema	12.024	10.752
Media crema	10.714	18.558

Valores propios:

	F1	F2
Valor propio	3184.172	374.969
% varianza	89.465	10.535
% acumulado	89.465	100.000

Número de valores propios triviales suprimidos: 15

Vectores propios:

	F1	F2
Suero	0.137	0.069
Salado	-0.127	-0.006
Dulce	-0.049	0.006
Amargo	0.261	-0.012
Jabón	0.339	0.095
Crema ácida	0.379	-0.020
Levadura	0.234	0.019
Procesado	0.419	0.005
Queso Fresco	-0.123	0.186
Oxidado	0.235	0.029
Leche cortada / PCL	0.306	0.461
Leche en polvo	0.100	-0.087
Crema	0.037	-0.458
Metálico	0.359	0.099
Fermentado	0.125	-0.099
Queso crema	-0.190	0.019
Media crema	-0.222	0.707

Coordenadas de las variables:

	F1	F2
Suero	7.728	1.341
Salado	-7.154	-0.117
Dulce	-2.772	0.120
Amargo	14.725	-0.223
Jabón	19.125	1.845
Crema ácida	21.414	-0.392
Levadura	13.224	0.360
Procesado	23.629	0.097
Queso Fresco	-6.917	3.593
Oxidado	13.286	0.556
Leche cortada / PCL	17.245	8.928
Leche en polvo	5.650	-1.679
Crema	2.064	-8.871
Metálico	20.271	1.915
Fermentado	7.074	-1.913
	-	-
Queso crema	10.746	0.371
	-	-
Media crema	12.526	13.693

Correlaciones de las variables con los factores:

	F1	F2
Suero	0.985	0.171
Salado	-1.000	-0.016
Dulce	-0.999	0.043
Amargo	1.000	-0.015
Jabón	0.995	0.096
Crema ácida	1.000	-0.018
Levadura	1.000	0.027
Procesado	1.000	0.004

Queso Fresco	-0.887	0.461
Oxidado	0.999	0.042
Leche cortada / PCL	0.888	0.460
Leche en polvo	0.959	-0.285
Crema	0.227	-0.974
Metálico	0.996	0.094
Fermentado	0.965	-0.261
Queso crema	-0.999	0.034
Media crema	-0.675	0.738

Cosenos cuadrados de las variables:

	F1	F2
Suero	0.971	0.029
Salado	1.000	0.000
Dulce	0.998	0.002
Amargo	1.000	0.000
Jabón	0.991	0.009
Crema ácida	1.000	0.000
Levadura	0.999	0.001
Procesado	1.000	0.000
Queso Fresco	0.787	0.213
Oxidado	0.998	0.002
Leche cortada / PCL	0.789	0.211
Leche en polvo	0.919	0.081
Crema	0.051	0.949
Metálico	0.991	0.009
Fermentado	0.932	0.068
Queso crema	0.999	0.001
Media crema	0.456	0.544

Contribuciones de las variables (%):

	F1	F2
Suero	1.876	0.479
Salado	1.607	0.004
Dulce	0.241	0.004
Amargo	6.810	0.013
Jabón	11.487	0.908
Crema ácida	14.401	0.041
Levadura	5.492	0.034
Procesado	17.534	0.002
Queso Fresco	1.503	3.443
Oxidado	5.544	0.082
Leche cortada / PCL	9.339	21.257
Leche en polvo	1.002	0.751
Crema	0.134	20.986
Metálico	12.905	0.978
Fermentado	1.572	0.976
Queso crema	3.626	0.037
Media crema	4.927	50.003

Coordenadas de las observaciones:

	F1	F2
Cheese 210	63.626	4.821
Cheese 250	19.647	21.319
Cheese HTST	43.979	16.498

Cosenos cuadrados de las observaciones:

	F1	F2
Cheese 210	0.994	0.006
Cheese 250	0.459	0.541
Cheese HTST	0.877	0.123

Contribuciones de las observaciones (%):

	F1	F2
Cheese 210	63.568	3.099
Cheese 250	6.061	60.605
Cheese HTST	30.371	36.296

QQ. Análisis de componentes principales de gustos de quesos panela elaborados con leches HTST y tratada por PM de HAP

XLSTAT 7.5.2 - Análisis de Componentes Principales (ACP) - el 28/07/2011 a 12:16:20 a.m.

Tabla: libro = Analisis Quesos PCA (Autoguardado).xls / hoja = Textura / rango = \$D\$58:\$H\$60 / 3 filas y 5 columnas

Ponderación uniforme (predeterminado)

Ningún dato omitido detectado

Covarianza (ACP no normalizado, varianzas en 1/(n-1))

Sin rotación de los ejes

Número de factores asociados a valores propios no triviales: 2

Media y desviación típica de las columnas:

	Media	Desviación típica
Arenoso	18.333	12.829
Suave	36.548	8.931
Quebradizo	25.119	17.425
Poroso	19.405	16.600
Creamy mouthfeel	12.500	21.651

Matriz de covarianza:

	Arenoso	Suave	Quebradizo	Poroso	Creamy mouthfeel
Arenoso	164.583	-73.810	161.905	-45.685	-203.125
Suave	-73.810	79.762	-154.677	-90.264	191.964
Quebradizo	161.905	-154.677	303.614	149.851	-377.232
Poroso	-45.685	-90.264	149.851	275.553	-183.036
Creamy mouthfeel	-203.125	191.964	-377.232	-183.036	468.750

Valores propios:

	F1	F2
Valor propio	1014.031	278.231
% varianza	78.469	21.531
% acumulado	78.469	100.000

Número de valores propios triviales suprimidos: 3

Vectores propios:

	F1	F2
Arenoso	-0.275	-0.563
Suave	0.280	-0.027
Quebradizo	-0.546	-0.062
Poroso	-0.296	0.819
Creamy mouthfeel	0.678	0.091

Coordenadas de las variables:

	F1	F2
Arenoso	-8.748	-9.384
Suave	8.920	-0.449
Quebradizo	-17.393	-1.039
Poroso	-9.432	13.660
Creamy mouthfeel	21.598	1.513

Correlaciones de las variables con los factores:

	F1	F2
Arenoso	-0.682	-0.731
Suave	0.999	-0.050
Quebradizo	-0.998	-0.060
Poroso	-0.568	0.823
Creamy mouthfeel	0.998	0.070

Cosenos cuadrados de las variables:

	F1	F2
Arenoso	0.465	0.535
Suave	0.997	0.003
Quebradizo	0.996	0.004
Poroso	0.323	0.677
Creamy mouthfeel	0.995	0.005

Contribuciones de las variables (%):

	F1	F2
Arenoso	7.546	31.651
Suave	7.846	0.073
Quebradizo	29.835	0.388
Poroso	8.773	67.065
Creamy mouthfeel	46.001	0.823

Coordenadas de las observaciones:

	F1	F2
Cheese 210	-20.565	15.967
Cheese 250	-16.115	-17.312
Cheese HTST	36.680	1.346

Cosenos cuadrados de las observaciones:

	F1	F2
Cheese 210	0.624	0.376
Cheese 250	0.464	0.536
Cheese HTST	0.999	0.001

Contribuciones de las observaciones (%):

	F1	F2
Cheese 210	20.854	45.813
Cheese 250	12.805	53.862
Cheese HTST	66.341	0.326

Anexo 3

Publicación relacionada con la tesis

ORIGINAL ARTICLE

Multiple-pass high-pressure homogenization of milk for the development of pasteurization-like processing conditions

H. Ruiz-Espinosa¹, G.G. Amador-Espejo², M.E. Barcenas-Pozos², J.O. Angulo-Guerrero³, H.S. Garcia³ and J. Welte-Chanes⁴

¹ Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

² Universidad de las Américas Puebla (UDLAP), Cholula, Puebla, México

³ UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, México

⁴ Tecnológico de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México

Significance and Impact of the Study: Milk is usually heat-preserved, but certain thermal-related modifications in nutritional, sensory and functional properties may arise. Consequently, nonthermal technologies such as ultrahigh pressure homogenization (UHPH) are currently explored. As part of the scientific criteria needed to assess UHPH equivalency to thermal pasteurization, microbial reduction of both the most baroresistant pathogen and native milk microflora must be determined and processing conditions could be defined through multiple response optimization. Results from the present study show that optimized multiple-pass UHPH treatments are capable of a 5-D reduction of both spoilage and pathogenic flora in whole milk.

Keywords

dairy, modelling, nonthermal processes, optimization.

Correspondence

Jorge Welte-Chanes, Tecnológico de Monterrey, Eugenio Garza Sada 2501, Col. Tecnológico, Monterrey, Nuevo León 64849, México. E-mail: jwelte@itesm.mx

2013/1127: received 20 June 2012, revised 29 October 2012 and accepted 20 November 2012

doi:10.1111/lam.12027

Abstract

Multiple-pass ultrahigh pressure homogenization (UHPH) was used for reducing microbial population of both indigenous spoilage microflora in whole raw milk and a baroresistant pathogen (*Staphylococcus aureus*) inoculated in whole sterile milk to define pasteurization-like processing conditions. Response surface methodology was followed and multiple response optimization of UHPH operating pressure (OP) (100, 175, 250 MPa) and number of passes (N) (1–5) was conducted through overlaid contour plot analysis. Increasing OP and N had a significant effect ($P < 0.05$) on microbial reduction of both spoilage microflora and *Staph. aureus* in milk. Optimized UHPH processes (five 202-MPa passes; four 232-MPa passes) defined a region where a 5- \log_{10} reduction of total bacterial count of milk and a baroresistant pathogen are attainable, as a requisite parameter for establishing an alternative method of pasteurization. Multiple-pass UHPH optimized conditions might help in producing safe milk without the detrimental effects associated with thermal pasteurization.

Introduction

Raw milk is commonly heat-treated to ensure microbiological safety and shelf stability. Although proven to be reliable, thermal treatments (TT) might cause undesirable sensory, functional and nutritive modifications in milk (Mújica-Paz *et al.* 2011). Consequently, gentler, nonthermal processing alternatives are sought (Diels *et al.* 2003) such as ultra high-pressure homogenization (UHPH). UHPH is applied through a modified homogenizer enabled to reach pressures up to 400 MPa. UHPH

reduces the microbial load of several fluid foods (Hayes *et al.* 2005; Welte-Chanes *et al.* 2009; Maresca *et al.* 2011) through shear stress, high-speed collisions, impingement and cavitation (Donsi *et al.* 2009). Operating pressure (OP), inlet temperature (IT) and number of passes (N) or consecutive cycles are the most relevant processing parameters, and by increasing these, microbial count reduction can be improved (Wuytack *et al.* 2002).

To make UHPH microbial reduction performance comparable with TTs, processing conditions must be proven to be sufficient to reduce counts of the most

baroresistant pathogen at least in an equal amount as that defined in the current food legislation. *Staphylococcus aureus* is considered to be the most UHPH-resistant native milk pathogen (Briñez *et al.* 2007). *Staphylococcus aureus* count reduction in UHPH-treated milk has been explored with indigenous (Hayes *et al.* 2005; Smiddy *et al.* 2007) and inoculated milk samples (Vannini *et al.* 2004; López-Pedemonte *et al.* 2006; Briñez *et al.* 2007) at varying OPs and ITs. No viable native *Staph. aureus* cells were detected in raw milk ($<3.0 \log_{10}$ CFU ml⁻¹) after treatments at 150 MPa/45°C (Hayes *et al.* 2005) and 200 MPa/55°C (Smiddy *et al.* 2007). Meanwhile, UHPH count reduction of inoculated milk samples ranged from 2.0 log₁₀ at 130 MPa and 20°C (Vannini *et al.* 2004) to 4.0 log₁₀ at 300 MPa and 20°C (Briñez *et al.* 2007). Native milk flora sensitivity to single and multiple UHPH passes have also been explored (Picart *et al.* 2006; Pereda *et al.* 2007; Smiddy *et al.* 2007). Microbial reduction expressed as total bacterial count (TBC) at single-pass UHPH treatments varied from 2.9 log₁₀ at 300 MPa and 24°C (Picart *et al.* 2006) to 3.5 log₁₀ at 300 MPa/40°C (Pereda *et al.* 2006, 2007). Meanwhile, multiple-pass treatments (Kheadr *et al.* 2002; Picart *et al.* 2006) reported average TBC reductions of 2.0–3.0 log₁₀ after three and five 200-MPa passes respectively.

Response surface methodology (RSM), a mathematical method that explores the influence of several explanatory variables on one or several responses, has been used in process optimization (Baş and Boyacı 2007) and could be a valuable tool for establishing improved UHPH conditions incorporating reduction data of both milk spoilage and a UHPH-resistant pathogenic micro-organism. The aim of this study was to investigate the reduction of both endogenous milk flora in raw milk and *Staph. aureus* inoculated in ultra-high temperature (UHT) milk through multiple-pass UHPH and to develop a multiple response optimization model as a preliminary approach to define UHPH processing conditions equivalent to thermal pasteurization from the microbial reduction standpoint.

Results and discussion

Mean content of fat, protein and pH value of raw milk were $2.99 \pm 0.04\%$, $2.71 \pm 0.02\%$ and 6.67 ± 0.02 respectively. TBC ranged from 5.5×10^4 to 1.2×10^5 CFU ml⁻¹.

UHPH-related temperature rise

Thermal-related microbial reduction was largely minimized as milk was rapidly cooled after the high pressure (HP) valve. Although the maximum temperature reached could not be recorded as no thermocouple was located at

the immediate outlet of the HP valve, milk temperature recorded before the LP valve did not increase beyond 40°C, even at the highest pressure applied (250 MPa). Fluid temperature increases in UHPH processing because of adiabatic heating and high shear forces, cavitation and turbulence (Diels and Michiels 2006). According to Picart *et al.* (2006), milk temperature increased up to 40–68°C after UHPH treatments at 100 and 250 MPa, respectively, using similar equipment and IT (24°C); however, holding time was about 215 ms. Linear temperature increases of 19.15°C and 18.5°C per 100 MPa with OP up to 300 MPa were, respectively, reported by Pereda *et al.* (2007) with IT of 40°C and Thiebaud *et al.* (2003) with ITs of 4–24°C. As milk temperature was rapidly reduced, holding time at the maximum temperature reached in the aforementioned UHPH processes was well below that of thermal pasteurization at the same temperature and, consequently, thermal-related changes in nutritional, sensory and technological characteristics of milk were mostly avoided.

TBC reduction by UHPH

Table 1 shows TBC reduction in raw milk by UHPH. Lethality increased with both OP and *N*. ANOVA showed a significant difference ($P < 0.05$) between both OP and *N* at all levels explored. Multi-pass UHPH treatments at 250 MPa (three, five passes) resulted in a TBC decrease of about 5.0 log₁₀, although only the latter exceeded this critical value.

TBC reduction was higher in this study than that observed by Picart *et al.* (2006) with single-pass processes using the same type of homogenizer at similar OPs (100–300 MPa) and IT (24°C). In that report, 0.7, 1.7, 2.3 and 2.9 log₁₀ TBC reductions were achieved with UHPH treatments at 100, 200, 250 and 300 MPa respectively. TBC decreased 3.5 log₁₀ with a single pass at 250-MPa (Table 1). Similar microbial inhibition was observed by Pereda *et al.* (2007) for UHPH at 300 MPa and 40°C, although it was higher for multiple-pass treatments when compared with previous studies. Picart *et al.* (2006) produced a 3.0-log₁₀ reduction in raw milk flora after three 200-MPa passes at 24°C. Dissimilarities could be attributed to differences in indigenous raw milk microbiota or cooling efficiency after homogenizing stages. The latter would influence outlet temperature and time lapse before cooling, thereby increasing the thermal contribution to microbial reduction.

UHPH reduction of *Staphylococcus aureus*

As before, *Staph. aureus* reduction rate increased with both OP and *N* (Table 2). The highest reduction was

Table 1 Observed (Obs) and predicted (Pred) ultrahigh pressure homogenization reductions of total bacterial count at fixed operating pressure (OP) and number of passes (*N*)

OP (MPa)	log ₁₀ reduction factor (S)					
	N = 1		N = 3		N = 5	
	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†
100	-0.09 ± 0.03 ^{Aa}	-0.40	-1.49 ± 0.18 ^{Ab}	-1.33	-2.08 ± 0.04 ^{Ac}	-2.25
175	-2.24 ± 0.11 ^{Ba}	-2.04	-3.84 ± 0.03 ^{Bb}	-3.25	-4.39 ± 0.17 ^{Bc}	-4.47
250	-3.51 ± 0.22 ^{Ca}	-3.68	-4.90 ± 0.26 ^{Cb}	-5.18	-6.65 ± 0.06 ^{Cc}	-6.68

Different capital letters within columns mean significant difference (*P* < 0.05).

Different lower letters within rows mean significant difference (*P* < 0.05).

*Values are mean ± SD (*n* = 4).

†Values are calculated using Eqn (1) at given OP and *N*.

Table 2 Observed (Obs) and predicted (Pred) ultrahigh pressure homogenization reductions of *Staphylococcus aureus* at fixed operating pressure (OP) and number of passes (*N*)

OP (MPa)	log ₁₀ reduction factor (S)					
	N = 1		N = 3		N = 5	
	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†	Obs*	Pred†
100	-0.64 ± 0.14 ^{Aa}	-0.68	-1.28 ± 0.06 ^{Aa}	-1.09	-2.21 ± 0.03 ^{Ab}	-2.70
175	-1.36 ± 0.01 ^{Aa}	-1.14	-2.18 ± 0.18 ^{Aa}	-1.75	-4.19 ± 0.36 ^{Ab}	-3.78
250	-2.76 ± 0.27 ^{Ba}	-3.44	-4.92 ± 0.05 ^{Ba}	-4.44	-6.07 ± 0.13 ^{Bb}	-6.26

Different capital letters within columns mean significant difference (*P* < 0.05).

Different lower letters within rows mean significant difference (*P* < 0.05).

*Values are mean ± SD (*n* = 4).

†Values are calculated using Eqn (2) at given OP and *N*.

obtained with five 250-MPa passes (6.1 log₁₀), while three 250-MPa passes and five 175-MPa passes also exceeded 4.0 log₁₀ (4.9 and 4.2, respectively). All the remaining treatments reduced less than 3.0 log₁₀ and could not be considered microbiologically safe.

ANOVA shows that both main factors and their interaction are significant (*P* < 0.05). OP had the most significant effect, followed by *N*. Although interaction reflected a synergistic effect between the main factors, its significance was comparatively low. There were significant differences (*P* < 0.05) for OP and *N* between treatments in the low/medium (*P* = 100, 175 MPa; one, three passes) and high-intensity range (*P* = 250 MPa; five passes) (Table 2).

Staphylococcus aureus reduction rate is in agreement with the results reported elsewhere (Vachon *et al.* 2002; Picart *et al.* 2006; Donsi *et al.* 2009); single-pass UHPH treatments showed a similar trend with respect to reports by López-Pedemonte *et al.* (2006) and Briñez *et al.* (2007). As mentioned, UHPH reduction extent increases with OP (Diels and Michiels 2006). In terms of *Staph. aureus* reduction by multiple-pass UHPH, our results are in agreement with those by Wuytack *et al.*

(2002) in phosphate-buffered saline (PBS), as lethality increased from <1.0 log₁₀ with a single-pass at 250 MPa/45°C to nearly 4.0 log₁₀ with four UHPH passes. Again, higher reduction yields were obtained in this research (5.0–6.0 log₁₀ with three and five 250-MPa passes) despite using whole milk and a lower IT (25°C). As a protective effect of the food matrix on microbial UHPH resistance (Vachon *et al.* 2002) was not observed, differences in multiple-pass UHPH effectiveness against *Staph. aureus* in PBS and inoculated milk might be attributed to both microbial-related (strain, growth phase) and equipment-related factors such as homogenizer valve design (Diels and Michiels 2006).

Mathematical modelling

Transformation was not required for TBC log₁₀ reduction data while reciprocal of the positive *Staph. aureus* log₁₀ reduction results was calculated to achieve a better distribution of model errors. Stepwise backward regression resulted in the elimination of second-order variables of model equations for both TBC and *Staph. aureus* log₁₀ reduction, but OP, *N* and their interaction remained

significant ($P < 0.05$). Equation (1) was obtained to model TBC reduction level [sum of square of errors (SSE) = 0.2981] by multiple-pass UHPH treatments.

$$S = 2.0652 - 0.0200P - 0.2737N - 0.0019PN \quad (1)$$

where: $S = \log_{10}$ cycle reductions; $P =$ pressure; $N =$ number of passes

A high adj. R^2 value (0.981) and no signs of deviations from model assumptions in the residuals-*vs*-fitted-value plot demonstrated model fit within the range of independent variables used; thus, a good correlation between predicted and observed values was expected (Table 1). Figure 1a shows the contour response plots for TBC reduction model, fitted for iso-reduction conditions at specific S ranges. UHPH treatments able to reach 5-log reductions in raw milk TBC were five 196-MPa passes and four 215-MPa passes.

Equation (2) was obtained to model *Staph. aureus* reduction by multiple-pass UHPH treatments (SSE = 0.1436).

$$S = \frac{1}{(0.0094P + 0.4327N - 0.0016PN - 2.6732)} \quad (2)$$

where: $S = \log_{10}$ cycle reductions; $P =$ pressure; $N =$ number of passes

As with the TBC model, multiple determination was reasonably high (adj. $R^2 = 0.896$) while residuals were randomly distributed in a residuals *vs* fitted-values plot and did not show any systematical pattern. Hence, the model was considered appropriate for describing the effect of UHPH an *Staph. aureus* reduction within the range of variables explored, as seen when comparing predicted and observed values (Table 2). Figure 1b shows a contour response plot for the proposed model, fitted for iso-reduction conditions at specific log S ranges. An increase in reduction level is observed when higher pressure and N were applied. An additive effect of multiple passes is also noted (e.g. reduction at one 250-MPa pass is similar to that of five 100-MPa passes). UHPH treatments of four 239-MPa passes and five 208-MPa passes are the minimum required for achieving the target 5-log reduction in *Staph. aureus* population.

An overlaid contour plot of Fig. 1a,b was used to determine optimized UHPH conditions at fixed N . However, as the parameters needed to produce a 5- \log_{10} reduction in microbial counts were always higher for *Staph. aureus* than for TBC, the optimized conditions could be directly obtained from Fig. 1a. Five 202-MPa passes and four 232-MPa passes were adequate to reduce TBC in 5.4 and 5.6 \log_{10} , respectively.

An accepted reduction in spoilage micro-organism that counts in several foodstuffs is 5D, but single-pass UHPH lethality rarely exceeds 4 \log_{10} when using matrices such

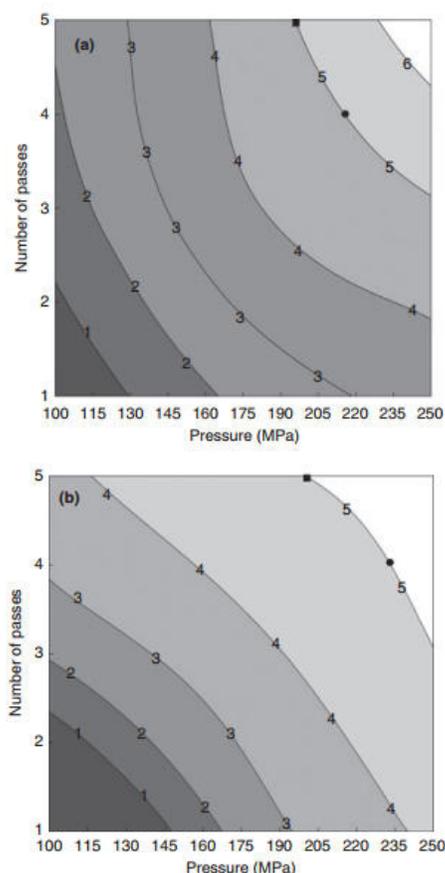


Figure 1 (a) Contour plots of predicted total bacterial count reduction by ultrahigh pressure homogenization (UHPH) fitted for iso-reduction conditions at specific S ranges. $S = 5$ with (●) $N = 4$ ($P = 215$ MPa) (■) $N = 5$ ($P = 196$ MPa) (b) Contour plots of predicted *Staphylococcus aureus* reduction by UHPH fitted for iso-reduction conditions at specific S ranges. $S = 5$ with (●) $N = 4$ ($P = 232$ MPa) (■) $N = 5$ ($P = 202$ MPa).

as milk (López-Pedemonte *et al.* 2006). In fact, no single-pass UHPH treatment capable of a 5-D reduction in TBC of raw milk was found in the literature. Pereda *et al.* (2007) suggested a single 300-MPa pass at 30°C as a viable simultaneous milk pasteurization/ homogenization processing alternative as the resulting shelf life was similar to that of TT (90°C, 15 s); however, it did not produce a

5D reduction in TBC ($S = 3.2$). Meanwhile, Smiddy *et al.* (2007) reported a five-log reduction in TBC in raw milk with a single 200-MPa pass; yet, since a very high IT was used (55–70°C), a predominance of thermal over mechanical effects prevailed in microbial reduction.

UHPH has been shown to affect casein micelles, whey proteins and fat globules in milk, especially at OPs higher than 200 MPa. UHPH conditions found by RSM (232 MPa/four passes; 202 MPa/five passes) were capable of reducing both spoilage and pathogenic counts in an equal or greater amount than 5.0 \log_{10} . Although we are aware of both, the difficulties of implementing multiple-pass UHPH treatments at the industrial level and the convenience of using higher ITs for producing comparable results in terms of microbial reduction in UHPH milk, such inlet conditions might limit milk processing capabilities because of increased thermal denaturation of whey protein (Hayes *et al.* 2005). Thus, appropriate OP/N combinations could be selected for processing milk when a temperature increase capable of causing important changes in functionality is not compatible with milk end-use.

Although safety might be assured according to the level of microbial reduction attained, milk shelf-life needs to be determined. Besides, further studies are necessary to identify possible biochemical, sensory, physicochemical and functional modifications in milk properties related to selected treatments. Despite higher costs of HP processing when compared to TT (Mújica-Paz *et al.* 2011), UHPH might be a suitable option for generating dairy products with unique functional and sensory characteristics.

Materials and methods

Milk samples

For endogenous flora tests, fresh raw whole milk was obtained locally and kept at 4°C until used. Raw milk fat and protein were determined using an ultrasonic milk analyzer (Lactoscan LA; Milkotronic Ltd, Nova Zagora, Bulgaria). Milk was standardized (30 g l⁻¹ fat) using raw skim milk and equilibrated at 25°C prior to UHPH processing. The pH of raw milk was assessed using a calibrated pH meter (Jenway 3030; Jenway Ltd, Felsted, UK). Commercial whole UHT milk (3% fat, 3.1% protein) was aseptically opened and used for *Staph. aureus* tests.

Staphylococcus aureus growth, suspension and UHT inoculation

Staphylococcus aureus ATCC 29213 was used for inoculation tests. For growth, a loop of *Staph. aureus* was transferred to brain heart infusion (BHI) broth (DIFCO,

Sparks, MD, USA) and grown at 37 ± 1°C for 20 h. Slant cultures were prepared on trypticase soy agar (TSA) (BD Bioxon, Cuautitlan Izcalli, Mexico) in screw-capped glass tubes, and incubated at 37 ± 1°C for 24 h. Tubes were maintained at 4 ± 1°C throughout the experiments. For each experiment, a loopful from the *Staph. aureus* slant culture was inoculated into 70 ml BHI broth and incubated at 37 ± 1°C for 20–24 h. A 0.1-ml sample was spread-plated in TSA. Inoculum concentration was determined by standard colony plate count. After incubation, BHI broth was mixed in the ratio 1 : 100 (v/v) with UHT milk (25°C). Initial cell concentration was kept within 1 × 10⁷–3 × 10⁸ CFU ml⁻¹. Inoculated UHT milk was thoroughly mixed and immediately UHPH-processed.

Ultra high pressure homogenization treatment

Both standardized raw milk and inoculated UHT milk were independently subjected to single or multiple-pass two-stage UHPH treatments using a hydraulically driven Stansted HP homogenizer (model nG7400:350 Hydride; Stansted Fluid Power Ltd, Essex, UK) which consists of two intensifiers forcing milk through a high-pressure-resistant ceramics valve capable of withstanding 250 MPa. A second-stage homogenization is applied using a pneumatic valve working at 10% the pressure of the first stage. Approximate flow rate was 15.0 l h⁻¹. The homogenizer was sanitized and disinfected by successively circulating a phosphate-based detergent and a chlorine solution (200 ppm) for 10 min each, rinsing it afterwards with distilled water. IT, temperature before low pressure valve and outlet temperature were monitored throughout the UHPH process. IT was kept constant at 25 ± 1°C. When multiple-pass treatments were implemented, the temperature of the milk samples was re-equilibrated if necessary. An external cooling jacket and a tubular heat exchanger with constant cold water (4°C) circulation were respectively placed before high and low pressure valves to rapidly reduce heating associated with the UHPH processes. Milk samples (100 ml) were collected in sterile bags and immediately refrigerated (4°C).

Microbiological analyses

Analyses were performed before and after UHPH treatment. Serial decimal dilutions of raw and UHT-inoculated milk samples were prepared in peptone water (peptone 10 g l⁻¹), pour-plated in duplicate in TSA and respectively incubated at 32 ± 1°C (for TBC) and 37 ± 1°C (for *Staph. aureus* enumeration) for 48 h. All the microbiological tests were conducted in duplicate. The number of colony forming units (CFU ml⁻¹) was determined and logarithmic reduction factor (S) values

were calculated as the difference between \log_{10} CFU before and after UHPH treatment.

Experimental design and statistical analysis

A two-factor, three-level face-centred experimental design was used. Respectively, TBC and *Staph. aureus* \log_{10} reductions were measured as responses. Independent variables were OP (100, 175 and 250 MPa) and N (1, 3 and 5). Each experiment and each measurement were performed in duplicate. All the tests were analyzed using MINITAB™ 14-0 software (Minitab Inc., State College, PA, USA). The differences between treatments for the same milk were analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey's pairwise mean comparisons ($P < 0.05$). RSM was applied to individually optimize TBC and *Staph. aureus* reduction and used to determine the OP/N combination to achieve a minimum 5- \log_{10} reduction of raw milk TBC and *Staph. aureus* in inoculated UHT milk. Second-order polynomial expressions were used as approximating functions. The quadratic model was expressed as:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (3)$$

where Y is the response variable; x_i and x_j are independent variables; b_0 , b_i , b_{ii} and b_{ij} are regression coefficient variables for intercept, linear, quadratic and interaction terms respectively. For prediction purposes, N was considered to be a discrete variable. Stepwise backward regression was applied to exclude the noncontributing variables ($P < 0.05$). The set of parameters that minimized the SSE was calculated. For each case, model fitness was evaluated using the adjusted regression coefficient (adj. R^2) and residuals-vs-fitted-values graphs were plotted to verify distributional normality and constant variance. Overlaid contour plots of TBC and *Staph. aureus* reduction as functions of OP and N were generated to find a possible region where both responses fall within the desired minimum 5- \log_{10} reduction values (Maass 2008).

Acknowledgements

Financial support from Tecnológico de Monterrey (Research Chair Funds CAT-200), CONACyT-SEP fund (grant 101700) and CONACyT (scholarship 290505) are acknowledged.

References

- Baş, D. and Boyacı, I.H. (2007) Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J Food Eng* **78**, 836–845.
- Briñez, W.J., Roig-Sagués, A., Hernández-Herrero, M. and Guamis, B. (2007) Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenization at inlet temperatures of 6 and 20 °C. *Food Control* **18**, 1282–1288.
- Diels, A.M.J. and Michiels, C.W. (2006) High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Crit Rev Microbiol* **32**, 201–216.
- Diels, A.M.J., Wuytack, E. and Michiels, C.W. (2003) Modeling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *Int J Food Microbiol* **87**, 55–62.
- Donsi, F., Ferrari, G., Lenza, E. and Maresca, P. (2009) Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: operating parameters and scale of operation. *Chem Eng Sci* **64**, 520–532.
- Hayes, M.G., Fox, P.F. and Kelly, A.L. (2005) Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *J Dairy Res* **72**, 25–33.
- Kheadr, E., Vachon, J.F., Paquin, P. and Fliss, I. (2002) Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *J Dairy Sci* **12**, 435–446.
- López-Pedemonte, T., Briñez, W.J., Roig-Sagués, X. and Guamis, B. (2006) Fate of *Staphylococcus aureus* in cheese treated by ultrahigh pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *J Dairy Sci* **89**, 4536–4544.
- Maass, E.C. (2008) Yield surface modeling. In *Encyclopedia of Statistics in Quality and Reliability* ed. Ruggeri, F., Kenett, R. S. and Faltin, F.W. pp. 2107–2112. New York: J. Wiley & Sons.
- Maresca, P., Donsi, F. and Ferrari, G. (2011) Application of a multi-pass high pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. *J Food Eng* **104**, 364–372.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Tonello Samson, C., Welti Chanes, J. and Torres, J.A. (2011) High pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess Technol* **4**, 969–985.
- Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B. and Trujillo, A.J. (2006) Effects of ultra-high pressure homogenization on natural-occurring microorganisms in bovine milk. *Milchwiss* **61**, 245–248.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. and Trujillo, A.J. (2007) Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *J Dairy Sci* **90**, 1081–1093.
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J.P., Cheftel, J.C. and Dumay, E. (2006) Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *J Dairy Res* **73**, 454–463.
- Smiddy, M.A., Martin, J., Huppertz, T. and Kelly, A. (2007) Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. *Int Dairy J* **17**, 29–32.

Dynamic high-pressure treated milk

H. Ruiz-Espinosa et al.

- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P. and Cheftel, J.C. (2003) High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int Dairy J* **13**, 427–439.
- Vachon, J.F., Kheadr, E.E., Giasson, J., Paquin, P. and Fliss, I. (2002) Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *J Food Prot* **65**, 345–352.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D. and Guerzoni, M.E. (2004) Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *Int J Food Microbiol* **94**, 123–135.
- Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C.E. and Guerrero-Beltrán, J. A. (2009) High pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innov Food Sci Emerg Technol* **10**, 457–462.
- Wuytack, E.Y., Diles, A.M.J. and Michiels, C.W. (2002) Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol* **77**, 205–212.