

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**

Departamento de Tecnología de Alimentos



**INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN GRASA  
SOBRE LA INACTIVACIÓN DE *E. COLI* EN LECHE  
MEDIANTE TRATAMIENTOS TÉRMICOS  
ASISTIDOS POR ULTRASONIDOS**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Alfredo Roig Bueno

TUTOR/A: José Javier Benedito Fort

Gabriela Clemente Polo

*Curso Académico: 2017/2018*

**VALENCIA, JULIO 2018**

Título: Influencia del contenido en grasa sobre la inactivación de *E.coli* en leche mediante tratamientos térmicos asistidos por ultrasonidos.

Resumen: La leche es un producto común en nuestra alimentación diaria, requiere de tratamientos que aseguren su inocuidad y seguridad para el consumo. En los últimos años los ultrasonidos de potencia se han utilizado para la intensificación de procesos de inactivación microbiana y limpieza. Debido a que anteriores estudios indican que la grasa puede actuar como una barrera térmica en la inactivación microbiana, el principal objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de la intensificación con ultrasonidos de potencia del tratamiento térmico de leche con diferentes contenidos en grasa. Se utilizaron muestras de leche entera (3,6% de grasa), mezclas de 1 y 2% de grasa así como leche desnatada (0,3% de grasa) a las que se inoculó *E.coli*. Los tratamientos se aplicaron durante 30 minutos. En primer lugar, se trabajó a una temperatura de 75°C (con y sin aplicación de ultrasonidos). Además, las muestras de leche entera se sometieron a un tratamiento a 70 y 80°C. Se evaluaron algunas de las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez, densidad y color) de la leche antes y después de los tratamientos para determinar la influencia de los tratamientos en dichas propiedades. Los resultados obtenidos indicaron que, en primer lugar, la termosonicación intensificaba la inactivación de *E.coli* CECT 101, acortando los tiempos de tratamiento. En experiencias efectuadas en agua, la inactivación total (no creció ninguna colonia después de la siembra) en el tratamiento térmico asistido por ultrasonidos se produjo a los 10 min, mientras que en el que se empleó únicamente calor, se necesitaron 20 min. Además, se demostró que el tiempo, tipo de tratamiento y el contenido en grasa tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en la inactivación de *E.coli* CECT 101. Se observó el efecto protector de la grasa, consiguiendo a los 5 minutos, en los tratamientos por termosonicación una reducción en la población microbiana de 5,26 ciclos-log en leche desnatada, mientras que en leche entera fue de 4,32 ciclos-log. El factor temperatura también tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en la inactivación de la bacteria, se pudo observar que en los tratamientos de termosonicación en leche entera a 70, 75 y 80°C, el ratio de inactivación aumentó al aumentar temperatura, pasando de un valor medio de 4,75 ciclos-log a 70°C a 5,95 ciclos-log a 80°C.

Finalmente, se observó que el empleo de calor y calor junto con ultrasonidos provocó ligeras variaciones en las propiedades fisicoquímicas. Mientras que la densidad se mantuvo en valores de 1,03 g/cm<sup>3</sup> para los dos tipos de tratamientos, la bajada del pH y el aumento de la acidez fueron mayores con la utilización de ultrasonidos. Pese a que para el ojo humano las diferencias no resultaban evidentes, el color varió con los dos tratamientos, siendo incluso mayor la variación sin el empleo de ultrasonidos. Por tanto, la intensificación ultrasónica del tratamiento térmico de la leche permite reducir los tiempos de tratamiento, sin disminuir la calidad del producto tratado.

Palabras clave: Leche, *E.coli*, ultrasonidos, tratamiento térmico, inactivación.

Títol: Influència del contingut en greix sobre la inactivació d'*E.coli* en llet mitjançant tractaments tèrmics assistits per ultrasons.

Resum: La llet es un producte comú en la nostra alimentació diària, requereix de tractaments que garanteixi la seua inocuitat i seguretat per al consum. En els últims anys els ultrasons de potència s'han utilitzat per la intensificació de processos de inactivació microbiana i neteja. Degut a que anteriors estudis indiquen que el greix pot actuar com una barrera tèrmica en la inactivació microbiana, el principal objectiu d'aquest treball ha sigut evaluar l'eficàcia de la intensificació amb ultrasons de potència del tractament tèrmic de llet amb diferents continguts en greix. S'utilitzaren mostres de llet sencera (3,6% de greix), barrejes de 1 y 2% de greix així com llet desgreixada (0,3%), a les quals es va inocular *E.coli*. Els tractaments es varen aplicar durant 30 minuts. En primer lloc, es va treballar a una temperatura de 75°C (amb y sense aplicació d'ultrasons). A més, les mostres de llet sencera es varen sotmetre a un tractament a 70 y 80°C. S'evaluaren algunes de les propietats fisicoquímiques (pH, acidesa, densitat i color) de les llets abans y després dels tractaments per determinar la influència dels tractaments en aquestes propietats. Els resultats obtinguts indicaren que, primerament, la termosonicació intensificava la inactivació de *E.coli* CECT 101, acurtant els temps de tractament. En experiències efectuades en aigua, la inactivació total (no va créixer ninguna colònia després de la sembra) en el tractament tèrmic assistit per ultrasons es va produir als 10 minuts, mentre que en el que es va emplear únicament calor, es necessitaren 20 minuts. A més, es va demostrar que el temps, tipus de tractament i contingut en greix varen tindre un efecte estadísticament significatiu ( $p < 0,05$ ) en la inactivació de *E.coli* CECT 101. Es va observar l'efecte protector del greix, aconseguint als 5 minuts, en els tractaments per termosonicació una reducció en la població microbiana de 5,26 cicles-log en llet desgreixada, mentre que en llet sencera va ser de 4,32 cicles-log. El factor temperatura també va tindre un efecte significatiu ( $p < 0,05$ ) en la inactivació de la bacteria, es va poder observar que en els tractaments per termosonicació en llet sencera a 70, 75 y 80°C, el ratio de inactivació va augmentar al augmentar temperatura, passant de un valor mig de 4,75 cicles-log a 70°C a 5,95 cicles-log a 80°C.

Finalment, es va observar que la utilització de calor y calor amb ultrasons provocà lleugeres variacions en les propietats fisicoquímiques. Mentre que la densitat es va mantindre en valors de 1,03 g/cm<sup>3</sup> per als dos tipus de tractaments, la baixada del pH i l'augment de la acidesa varen ser majors amb l'utilització d'ultrasons. Encara que per a l'ull humà les diferències no varen resultar evidents, el color va variar amb els dos tractaments, següent inclús major la variació sense l'ús d'ultrasons. Per tant, la intensificació ultrasònica del tractament tèrmic de la llet permet reduir els temps de tractament, sense disminuir la qualitat del producte tractat.

Paraules clau: Llet, *E.coli*, ultrasons, tractament tèrmic, inactivació.

Title: Influence of the fat content on *E.coli*'s inactivation in milk by means of ultrasonic-assisted thermal treatments.

Abstract: Milk is a common product in our daily supply, it needs treatments that assure his innocuousness and safety for the consumption. Recently power ultrasounds have been use for the intensification process of microbial inactivation and cleaning. Due to the fact that previous studies indicate that the fat can act as a thermal barrier in the microbial inactivation, the main aim of this work has been to evaluate the efficiency of the intensification with power ultrasounds on the thermal treatment of milk with different contents in fat. Samples of whole milk (3,6 % of fat), mixes from 1 and 2 % of fat as well as skimmed milk (0,3 % of fat) were used and inoculated with *E.coli*. Treatments were applied during 30 minutes. Firstly, a temperature of 75°C (with and without application of ultrasounds) was used. In addition, the samples of whole milk were treated at 70 and 80°C. Some of the physicochemical properties (pH, acidity, density and color) of the milk were evaluated before and after the treatments to determine the influence of the treatments on the mentioned properties. The obtained results indicated that, in first term, the termosonication was intensifying *E.coli*'s CECT 101 inactivation, shortening the times of treatment. In experiments conducted in water, the total inactivation (no colony grown after plating) in the thermal treatment assisted by ultrasounds took place in 10 minutes, whereas with only heat, 20 minutes were needed. In addition, it was demonstrated that the time, type of treatment and the content of fat had a statistically significant ( $p < 0.05$ ) effect in *E.coli*'s inactivation CECT 101. The protective effect of the fat was observed, obtaining after 5 minutes of termosonication a reduction in the microbial population of 5,26 log-cycles in skimmed milk, whereas in whole milk it was 4,32 log-cycles. The temperature factor also had a significant ( $p < 0,05$ ) effect on the inactivation of the bacterium, it was possible to observe that in the treatments of termosonication in whole milk at 70, 75 and 80°C, the ratio of inactivation increased as temperature increased, ranging from an average value of 4,75 log-cycles at 70°C to 5,95 log-cycles at 80°C.

Finally, it was observed that the employment of heat and heat with ultrasounds caused slight variations in the physicochemical properties. Whereas the density was kept in values of 1,03 g/cm<sup>3</sup> for both types of treatments, the descent of the pH and the increase of the acidity were larger with the use of ultrasounds. In spite of that, the human eye couldn't appreciate the differences, the color changed with both treatments, being even larger the variation without the employment of ultrasounds. Therefore, the ultrasonic intensification of the thermal treatment of milk allows to reduce the times of treatment, without decreasing the quality of the treated product.

Key words: Milk, *E.coli*, ultrasounds, thermal treatment, inactivation.

# ÍNDICE DE GENERAL

## Contenido

1. Introducción .....	1
1.1 La leche: características y situación en el mercado .....	1
1.2 Tratamientos térmicos en leche. ....	2
1.3. <i>Escherichia coli</i> . Características .....	4
1.4 Ultrasonidos y efectos con la combinación de calor. Termosonicación .....	5
1.5 Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la leche.....	6
1.6. Objetivo del trabajo .....	7
2. Materiales y métodos .....	8
2.1 Muestras de leche y planificación experimental.....	8
2.2 Análisis de <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.2.1 Crecimiento de la bacteria.....	10
2.2.2 Cultivo y recuento de los supervivientes .....	11
2.3 Tratamientos aplicados a las muestras de leche. ....	12
2.3.1 Tratamiento térmico .....	13
2.3.2 Tratamiento de termosonicación.....	13
2.4 Análisis de proteína y grasa .....	14
2.5 Otros parámetros fisicoquímicos.....	16
2.5.1 pH y acidez.....	16
2.5.2 Densidad .....	18
2.5.3 Medida de Color .....	19
2.6 Modelización de la cinética de inactivación microbiana.....	20
2.7 Análisis estadísticos.....	21
3. Resultados y discusión.....	21
3.1 Tratamientos de inactivación en agua. Efecto de los ultrasonidos.....	21
3.2 Inactivación de <i>E.coli</i> CECT 101 en diferentes tipos de leche.....	23
3.2.1 Tratamiento térmico en distintos tipos de leche .....	23
3.2.2 Tratamiento térmico asistido por ultrasonidos en distintos tipos de leche. ....	24
3.2.3 Tratamiento térmico asistido por ultrasonidos en leche entera. Efecto de la temperatura. ....	26
3.3 Modelización matemática de la inactivación microbiana. ....	28
3.4 Análisis de proteínas y grasa.....	30
3.5. Efecto de los tratamientos sobre las características fisicoquímicas de la leche.....	31
3.5.1 pH y acidez.....	31
3.5.2 Densidad. ....	32
3.5.3 Color .....	32
4. Conclusiones. ....	35
5. Bibliografía.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros medios (modelo y estadísticos) del Modelo de Weibull

Tabla 2: Parámetros medios (modelo y estadísticos) del Modelo de Peleg tipo B

Tabla 3: Parámetros medios (modelo y estadísticos) del Modelo de Gompertz

Tabla 4: Resultados método Kjeldahl en leche

Tabla 5: Resultados de porcentaje graso en leche

Tabla 6: Valores de pH y Acidez en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico a 75°C

Tabla 7: Valores de pH y Acidez en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico asistido por ultrasonidos a 75°C

Tabla 8: Estándares de color CIELAB en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico a 75°C.

Tabla 9: Estándares de color CIELAB en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico asistido por ultrasonidos a 75°C.

Tabla 10: Diferencias de color después de los tratamientos

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Equipo de Pasteurización en leche

Figura 2.1: Esquema general de la investigación. TT: tratamiento térmico; TS: termosonicación.

Figura 2.2: Cuadrado de Pearson

Figura 2.3: Plan de trabajo *E.coli* CECT 101

Figura 2.4: Cámara de incubación y agitador orbital ( J.P. SELECTA)

Figura 2.5: Estufa VACIOTEM-T, Modelo 400148

Figura 2.6: Medidor de Potencial digital, Yokogawa, Modelo WT210

Figura 2.7: Baño de tratamiento

Figura 2.8: pH-metro; VWR, Modelo IS 2000L

Figura 2.9: Lactodensímetro Quevenne; Proton Modelo 28603

Figura 2.10: Espectrofotómetro CM-2500d, Fabricado en Japón

Figura 3.1: Valores experimentales de la reducción media de microorganismos a diferentes tiempos de tratamiento para agua

Figura 3.2: Valores experimentales de la reducción media de microorganismos en distintos tipos de leche y agua a diferentes tiempos de tratamiento térmico

Figura 3.3: Valores experimentales de la reducción media de microorganismos en distintos tipos de leche y agua a diferentes tiempos de tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos

Figura 3.4: Prueba de Múltiple Rango para la Inactivación de *E.coli* por tipo de tratamiento

Figura 3.5: Prueba de Múltiple Rango para la Inactivación de *E.coli* por tipo de muestra

Figura 3.6: Valores experimentales de la reducción media de microorganismos en leche entera a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos

Figura 3.7 Prueba de Múltiple Rango para la inactivación de *E.coli* CECT 101 en leche entera tratada por termosonicación mediante distintas temperaturas.

## **1. Introducción**

### **1.1 La leche: características y situación en el mercado**

La leche es un producto común en la alimentación diaria, de alta demanda internacional y que aporta a la dieta proteínas de alto valor biológico, así como azúcares importantes que proporcionan energía. Según la definición legal, la leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior (CODEX STAN 206-1999). Para que la leche cruda procedente de granjas se pueda comercializar, tiene que tener como máximo un recuento de gérmenes totales a 30°C de 100000 unidades formadoras de colonia por cada mililitro (UFC/ml) para leche de vaca, 1500000 (UFC/ml) para leche de oveja y 500000 (UFC/ml) para leche de cabra (Reglamento (CE) 853/2004).

Debido a la creciente demanda del producto, se ha hecho necesario intensificar su producción por medio de prácticas de manejo de los animales, principalmente bovinos, seleccionando las razas especializadas en la producción de leche, mejorando los sistemas de ordeño y desarrollando nueva tecnología. La industria española de la leche es un sector con una facturación de 13.000 millones de euros y que representa un 2% de la producción industrial del país.

A España, incorporada a la Unión Europea en 1986, se le asignó una cuota de producción de 4,65 millones de toneladas anuales para la venta a las industrias y de otras 750.000 toneladas para la venta directa. Lo que daba un total de 5,4 millones de toneladas frente a una demanda total de leche y productos lácteos de 9 millones. Desde los productores hasta la industria siempre han manifestado que esas restricciones frenaban su crecimiento.

En cuanto a las explotaciones ganaderas, se ha pasado de las 17.090 granjas que existían en enero de 2015 a 14.424 tres años más tarde, un recorte de un 15%, esto equivale a 2,5 granjas cada día. En Galicia, la principal zona productora, en el mismo periodo se pasó de 9.606 a 7.967 explotaciones, con un recorte de 1.639 granjas, es decir, un 17% menos. De cada seis granjas lecheras que había en España en 1997, cinco han cerrado desde entonces.

Gran parte de la responsabilidad de esto lo tiene la propia estructura tradicional del sector lácteo español, con cabañas ganaderas dominadas por el minifundismo escasamente viables, con una población envejecida y sin relevo generacional. Actualmente los cierres de explotaciones son más a causa de la falta de rentabilidad que al envejecimiento de sus titulares. En relación a la evolución de las explotaciones, en los últimos tres años el censo de animales adultos en edad productiva se ha mantenido prácticamente estabilizado en una media de 853.000 cabezas. En este periodo se ha producido más con el mismo número de vacas, la producción de leche se ha incrementado en una media del 5%, pasando de 6.651.000 toneladas en 2014 a 7.020.000 toneladas en 2017.

En Galicia se encuentran más de la mitad de las explotaciones lácteas (55% en 2018). Por otra parte, la variación de la producción de leche en las distintas regiones del país ha resultado poco significativa como para hablar de deslocalización. Tampoco han cambiado los precios, tras las elevadas cotizaciones de 2014, que llegaron a estar por encima de los 0,36 euros por litro, la crisis siguiente los puso por debajo de los 0,30 euros. Desde 2015 subieron ligeramente por la mejora general de los mercados, para situarse hoy en una media de 0,33 euros, estando todavía lejos de los más de 0,36 euros de media de la Unión Europea.

Con o sin cuotas, los precios a la baja del sector lechero en España siguen marcados por las importaciones, aunque más reducidas, de leche excedentaria barata del resto de los países comunitarios. Los precios a la baja no son consecuencia por tanto de un aumento de la oferta interior del 5%, sino por las importaciones.

## **1.2 Tratamientos térmicos en leche.**

Al determinar las condiciones de un tratamiento térmico deben considerarse varios factores; el microorganismo/espora/enzima objetivo y su termoresistencia, el pH del alimento, las condiciones de calentamiento, las propiedades termo-físicas, el tamaño y forma del alimento/envase además de las condiciones de almacenamiento posteriores al tratamiento. Los tratamientos térmicos que se aplican a la leche antes de su comercialización son la pasteurización y la esterilización.

La pasteurización es un tratamiento térmico suave, con una temperatura de trabajo inferior a 100°C. Su poder de conservación se debe a la inactivación de enzimas y destrucción de microorganismos termosensibles. Provoca mínimas variaciones en el valor nutritivo y las características organolépticas, al utilizarse temperaturas de tratamiento suaves.

La leche tiene un pH superior a 4,5 por lo que el objetivo del tratamiento será la destrucción de patógenos. Estos patógenos en leche pueden ser *Brucella abortis* o *Mycobacterium tuberculosis*, como objetivo secundario en leche estará la destrucción de enzimas y gérmenes causantes de alteración. Las condiciones de tratamiento pueden ser en torno a 63°C durante 30 min o a 71,5°C durante 15 segundos (Holdsworth, 1997).

Los sistemas de pasteurización pueden consistir en un sistema tipo intercambiador de calor, con zona de mantenimiento y un posterior envasado aséptico, sistemas que trabajan en continuo. Otra posibilidad es realizar un envasado y a continuación un tratamiento térmico sobre el envase en baño abierto, trabajando en este caso por lotes (discontinuo).

Los equipos de pasteurización son muy utilizados en la industria láctea, los intercambiadores de calor pueden ser de placas o de tipo tubular. Estos equipos calientan y enfrían la leche mediante un adecuado balance de materia y energía.

Los intercambiadores de calor de tipo placas son más utilizados debido a que tienen mayor superficie de contacto, su bajo coste, sencillez y gran rendimiento con fluidos newtonianos como la leche (Mott, 2006). Si se desea mantener la calidad de la leche se recomiendan los intercambiadores de placa (Fig.1 Pasteurizador leche). También se pueden utilizar los intercambiadores de calor tubulares, pero operan mejor con fluidos más viscosos.



**Fig.1:** Equipo de pasteurización en leche

La esterilización es la operación unitaria en la que los alimentos son calentados a una temperatura suficientemente elevada y un tiempo suficientemente largo, como para destruir toda la actividad microbiana y enzimática.

La leche, se esteriliza antes del envasado realizándose después un envasado aséptico. Habitualmente la leche se esteriliza empleando sistemas a temperaturas ultra-altas (UHT, por sus siglas en inglés). Utilizado para la esterilización de alimentos con bajo nivel de acidez, el tratamiento a temperaturas ultra-altas (UHT) consiste en calentar el producto a más de 135 °C, durante 3 o 4 segundos, como máximo (Holdsworth, 1997). La esterilización comercial destruye todos los microorganismos y enzimas de la leche, lo que hace que el producto final sea apto para la distribución a temperatura ambiente.

Entre los factores que determinan lo rápidamente que la leche se calienta o enfría durante un procesado térmico se encuentran los valores de difusividad térmica y calor específico.

La mayoría de los alimentos son malos conductores del calor, por lo que los procesos de transferencia de calor en los que la conducción es el mecanismo predominante son lentos. El agua es el componente que ejerce mayor influencia y tiene una conductividad, calor específico y difusividad mucho mayor que el resto de los componentes alimentarios como proteínas y grasa.

Por tanto, uno de los factores que influyen en la efectividad del tratamiento térmico en la inactivación de microorganismos y enzimas es el contenido en grasa de la leche.

Según Zapico y col. (1999) la grasa puede ser una barrera para la inactivación bacteriana. En este sentido, Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas (2007) demostraron que el contenido en grasa fue un obstáculo en la inactivación de *Listeria innocua* en leche bajo tratamientos de termosonicación, disminuyendo la velocidad de inactivación. Estos autores demostraron que después de 30 minutos de tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos a 63°C y 400 W de potencia, la leche entera mostró una reducción de 2,5 ciclos logarítmicos mientras que en la desnatada fue de 4,9 ciclos logarítmicos.

### **1.3. *Escherichia coli*. Características**

Ya que la leche es un alimento de baja acidez, los agentes causantes de deterioro pueden ser bacteria mesófilas anaerobias formadoras de esporas termófilas, además de algunas enzimas presentes en alimentos.

En este TFG se va a inocular el microorganismo *Escherichia coli* CECT 101 a diferentes muestras de leche.

Se empleó esta bacteria como microorganismo modelo ya que, aunque no sea un microorganismo indicador de la leche, podría contaminar en un caso real la leche por falta de higiene y en concreto esta cepa porque no representa un peligro para su manejo en laboratorio, siendo similar en morfología y termoresistencia a otras patógenas como la *E. coli* O157:H7.

*E.coli* se trata de una bacteria Gram negativa, el tamaño promedio es de 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho por 3  $\mu\text{m}$  de largo. Algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermentan la glucosa y la lactosa, son catalasa positivos (la bacteria posee la enzima catalasa), oxidasa negativos (la bacteria no posee la enzima oxidasa) y reducen los nitratos a nitritos. Su presencia indica contaminación fecal directa o indirecta, falta de limpieza en el proceso o almacenamiento inadecuado. Su hábitat es el tracto entérico del hombre y animales y pueden desempeñar un papel importante en ayudar a nuestro cuerpo a digerir los alimentos.

Además, *Escherichia coli* y otras bacterias, aparte de ser necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo pueden ser responsables de producir vitaminas B y K. La mayoría no son patógenas, pero existen algunas que sí lo son en alimentos, por ejemplo, las enteropatogénicas, enterotoxigénicas, enteroinvasivas o las enterohemorrágicas.

Respecto a la cepa que utilizamos, su temperatura de crecimiento óptimo es de 37°C y el tiempo de incubación 24 horas, está considerada como de riesgo 1 dentro de las especies de *E.coli*. Por tanto, generalmente no causará problemas de salud en adultos. Sin embargo otras cepas como la *E.coli* O157:H7 o *E.coli* O104:H4 sí son patógenas, pudiendo causar diarrea grave con sangre o el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), este último destruye los glóbulos rojos y causa insuficiencia renal. La *E.coli* O157:H7 se transmite con más frecuencia a las personas cuando comen o beben alimentos contaminados que no han sido pasteurizados, debidamente lavados o cocinados adecuadamente. La *E.coli* en las heces de una persona infectada puede dar lugar a contaminación cruzada si la persona no se lava bien las manos con agua y jabón, y procede a la manipulación de alimentos. Algunas personas pueden no presentar síntomas y sin embargo transmitir la bacteria.

#### **1.4 Ultrasonidos y efectos con la combinación de calor. Termosonicación**

Los ultrasonidos se definen como una serie de ondas elásticas que viajan a través del medio conductor produciendo compresión (alta presión) y rarefacción (baja presión) y cuya frecuencia supera a la del sonido audible por el oído humano (20 kHz) (Mulet y col., 1999).

De la misma manera que cualquier sonido, los ultrasonidos se transmiten a través de toda sustancia que posea propiedades elásticas, independientemente de su estado físico. La fuente de producción de ultrasonidos suele ser un cuerpo vibrante. La vibración de dicho cuerpo se comunica a las moléculas del medio, cada una de estas lo transmiten a las adjuntas, para posteriormente retornar aproximadamente a su posición original.

Una aplicación muy extendida de los ultrasonidos a nivel industrial es la limpieza empleando baños de ultrasonidos. La limpieza por ultrasonidos está fundamentada en el fenómeno denominado cavitación, provocado al aplicarse en un fluido una señal vibratoria ultrasónica de alta frecuencia. La formación de millones de microburbujas y la violenta implosión de las mismas producen la cavitación. Estas microburbujas se distribuyen alrededor del objeto a tratar y la implosión de las mismas actúa limpiándolo y proporcionando una intensa acción de micro cepillado sobre la superficie del objeto, arrancando la suciedad sin rayar ni dañar la superficie a limpiar.

En los últimos años se ha demostrado que la tecnología de ultrasonidos es altamente beneficiosa para la intensificación del procesado de alimentos. Los ultrasonidos generan fenómenos físicos y químicos diferentes a los generados por otras tecnologías en el procesado o conservación de alimentos. Las ventajas de la intensificación ultrasónica de los tratamientos térmicos incluyen la minimización de pérdida de sabor, mayor homogeneidad y ahorro energético (Zhue y col., 2007). Según Piyasena y col. (2003), el empleo de únicamente ultrasonidos no es especialmente efectivo en la inactivación bacteriana en alimentos, sin embargo, el uso de ultrasonidos junto con presión y/o calor presenta un gran potencial.

La inactivación por ultrasonidos se incrementa por el aumento de la potencia ultrasónica (Koda y col., 2009). Además se ha demostrado que los tiempos de tratamiento para alcanzar una reducción de 5 log, en poblaciones de *E.coli* K12, se pueden acortar de forma significativa por Manotermosonicación y Termosonicación, en comparación con los tratamientos individuales de Manosonicación, Sonicación y tratamientos por calor (Lee y col., 2009). La presurización, aumenta el poder de implosión de las burbujas de cavitación y aumenta la inactivación. En general, la velocidad de inactivación aumenta con la presión, necesitándose tiempos de exposición más cortos a presiones más elevadas (Lin y col., 1993; Hong & Pyun, 1999).

### **1.5 Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la leche.**

Existen numerosas características involucradas en la calidad de la leche: composición y propiedades físicas, características higieniconanitarias, organolépticas, adulteraciones, etc. Las industrias tienen asumido que la calidad de los productos que ofrecen a los consumidores y, por tanto, su competitividad, depende en gran medida de la materia prima, de esta manera el sector industrial suele pagar a los productores en función de la calidad de ésta.

Los parámetros fisicoquímicos más importantes por determinar en la leche son densidad y punto crioscópico, que permiten detectar por ejemplo posibles fraudes por adición de agua. Acidez y pH para estimar la calidad higiénica y también es importante estandarizar el color para así tener un control objetivo de este. En la leche acabada de ordeñar, procedente de animales sanos, el pH está comprendido entre 6,6 y 6,8 a causa, principalmente, de los grupos ácidos de las proteínas y de las sales de fosfato. En el caso de leches procedentes de vacas afectadas por mastitis, alteración de las glándulas mamarias, el pH puede alcanzar valores de 7 o 7,5.

Por el contrario, en el calostro o cuando las bacterias actúan sobre la leche, el pH tiende a disminuir, ya que en el caso de estas últimas producen grupos ácidos, principalmente ácido láctico a partir de lactosa. Las mediciones se realizan mediante pH-metro.

La determinación de la acidez de la leche resulta interesante porque sirve como indicativo de calidad. En general, al aumentar la contaminación bacteriana de la leche, tiende a aumentar la acidez, principalmente porque los gérmenes fermentan la lactosa a ácido láctico. La reacción de la leche recién ordeñada suele ser ligeramente alcalina, anfótera o ligeramente ácida. Sin embargo, debido a la acción de la temperatura, de los fermentos y de los gérmenes que la suelen contaminar, se acidifica rápidamente por la fermentación anteriormente mencionada. La determinación de la acidez se realiza mediante una valoración ácido-base.

La evaluación de la densidad se suele utilizar para detectar fraudes en las industrias. A lo largo de los años ha habido productores que añadían agua para aumentar el volumen de su producción lechera y consecuentemente obtener mayores beneficios al venderla. La lectura de la densidad se realiza mediante Lactodensímetros, un aerómetro específico para la leche.

La medida del color en leche se realiza mediante espectrofotómetros o espectrocolorímetros, siendo estos últimos los más utilizados en la industria, ya que permiten seleccionar distintos iluminantes y observadores, proporcionan el espectro completo de reflexión o transmisión, convierten los valores medidos a cualquier espacio de color y son conectables a un ordenador.

## **1.6. Objetivo del trabajo**

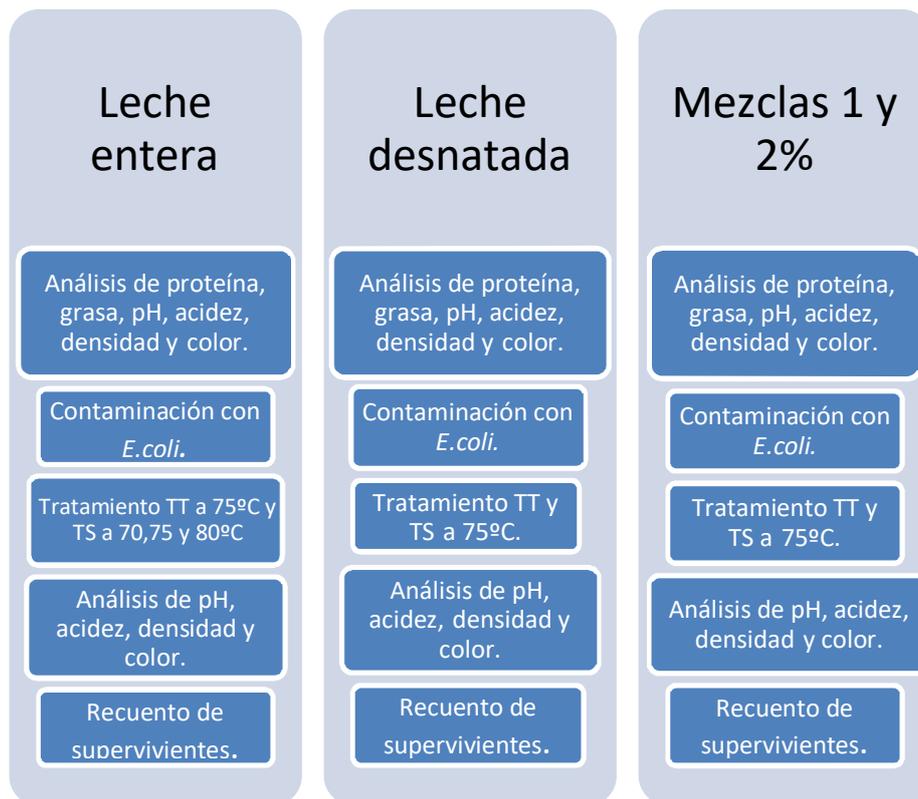
El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto del contenido en grasa sobre el proceso de termosonicación de la leche. Se determinará si los ultrasonidos reducen los tiempos de tratamiento y qué efecto se obtiene al tratar a diferentes temperaturas por termosonicación, la leche que proporciona más termoresistencia a los microorganismos.

Se estudiará el efecto de los tratamientos tanto sobre la inactivación de la bacteria *Escherichia coli* CECT 101, como sobre las variaciones de las propiedades fisicoquímicas de la leche.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Muestras de leche y planificación experimental

En la figura 2.1 se muestra el esquema general del trabajo realizado en el presente TFG con los distintos tipos de leche empleados.



**Fig.2.1:** Esquema general de la investigación. TT: tratamiento térmico; TS: termosonicación.

En el trabajo fueron utilizados cuatro tipos de leche pasteurizada con distinto porcentaje graso (leche desnatada con 0,3%, mezclas de 1% y 2% así como leche entera con un 3,6% de grasa). Las mezclas se prepararon a partir del método cuadrado de Pearson. Este método es un balance de materia grasa de sencilla aplicación y de útil manejo en la industria de la leche y todos sus derivados. El método se describe a continuación.

Se elabora un cuadrado (Fig. 2.2) y se definen 5 parámetros, los vértices y el centro de la figura. Estos serán representados por las letras A, B, C, D y E, siendo:

A= El valor de mayor contenido en grasa (% graso de leche entera).

B= El valor de menor contenido en grasa (% graso de leche desnatada).

C= El valor de la diferencia entre el % de grasa deseado y el valor de menor contenido en grasa.

D= El valor de la diferencia entre el valor de mayor contenido en grasa y el % de grasa deseado.

E= El porcentaje graso deseado para la mezcla.

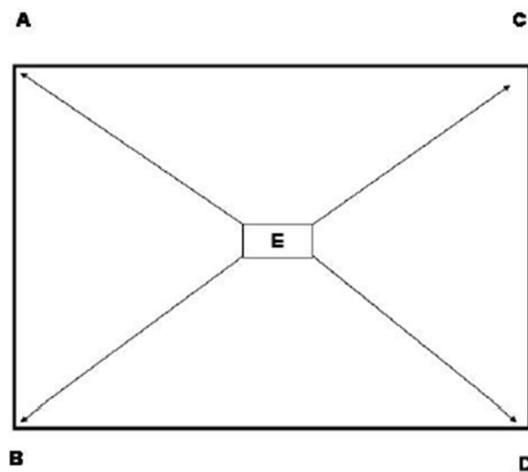


Fig.2.2: Cuadrado de Pearson

Para determinar las cantidades de leche entera y desnatada a mezclar con la finalidad de producir las mezclas deseadas, se deben utilizar las correspondientes ecuaciones, la ecuación 1 para determinar los mL a utilizar de leche entera y la ecuación 2 para calcular los mL requeridos de leche desnatada.

$$mL \text{ leche entera} = \frac{C}{A-B} \times 1000 \quad (\text{Ec.1})$$

$$mL \text{ leche desnatada} = \frac{D}{A-B} \times 1000 \quad (\text{Ec.2})$$

Las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C respetando su vida útil. Para el manejo de la leche, siempre se utilizaron condiciones de asepsia, material esterilizado y se operó en cabina microbiológica de flujo laminar (Telstar Technologies S.L, Modelo AH-100, Terrasa, España) con mechero y ventilación.

## **2.2 Análisis de *Escherichia coli***

### **2.2.1 Crecimiento de la bacteria**



**Figura 2.3:** Plan de trabajo con *E.coli* CECT 101

Dado que la fase de crecimiento en la que se encuentran los microorganismos afecta a la resistencia que éstos ofrecen a los tratamientos de inactivación, la curva de crecimiento de *E. coli* fue estandarizada, para conocer el tiempo de incubación necesario hasta alcanzar la fase de crecimiento deseada.

Para ello, una colonia fue inoculada en 50 mL de medio de crecimiento estéril y se dejó crecer durante toda la noche a la temperatura de 37°C, siendo ésta la adecuada para el microorganismo seleccionado.

Posteriormente, 50 µL de este cultivo fueron inoculados en 50 mL de un nuevo medio estéril, momento inicial de la curva de crecimiento. El tiempo óptimo para alcanzar la fase estacionaria del cultivo inoculado se determinó del trabajo de Ortuño (2014), estableciéndose en 14 horas.

Tal y como se muestra en la figura 2.3, las colonias de *E.coli* empleadas en la investigación se obtuvieron a partir de la siembra de una placa por triple estría de la cepa CECT 101 de *E.coli* adquirida en forma liofilizada de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, España). La siembra por triple estría es una técnica de siembra que se basa en deslizar haciendo zigzag el asa de siembra inoculada con la bacteria por la mitad de la superficie del agar de la placa PCA (Agar Plate Count) hasta agotarlo. Después se esteriliza el asa, se gira 90° la placa y por arrastre de los microorganismos depositados anteriormente se realiza otro zigzag. Finalmente se realiza otra vez el mismo procedimiento y así se obtuvieron colonias aisladas. La incubación de la placa fue de 24 horas a 37°C.

Una vez se consiguió colonias aisladas de la bacteria *E.coli* CECT 101 se inoculó una colonia en un matraz de 50 mL con caldo Nutrient Broth (sustrato rico en nutrientes para

la bacteria) sobre 24 horas a 37°C, experimentalmente se observó que 14-18 horas eran suficientes. A continuación, después del tiempo mencionado, se inocularon 50 µL del cultivo en otro Erlenmeyer de 50mL con Nutrient Broth y se mantuvo durante 14 horas a su temperatura óptima. Los crecimientos con caldo Nutrient Broth se realizaron en una cámara incubadora (Fig. 2.4, J.P. SELECTA, Modelo 3000957, Barcelona, España) acondicionado para la temperatura empleada y situada sobre un orbital a 120 rpm (Fig. 2.4, J.P. SELECTA, Rotabit Modelo 3000974, Barcelona, España). Por otra parte los crecimientos de placas (PCA) con *E.coli* CECT 101 siempre fueron en estufa (Fig.2.5 VACIOTEM-T Modelo 400148, Barcelona, España).



**Fig.2.4:** Cámara de incubación y agitador orbital (J.P. SELECTA)

Una vez realizada la incubación, manteniendo siempre las condiciones de asepsia y respetando las pautas de higiene, se pipetearon 5 mL del último cultivo a 60 mL de la muestra de leche a tratar. Los tratamientos aplicados a las distintas muestras de leche de explicarán en el apartado 2.3.

### **2.2.2 Cultivo y recuento de los supervivientes**

Finalizado cada tratamiento térmico, se almacenaron los tubos de vidrio en frío a 4°C mientras se preparaba el material a utilizar en la cabina de flujo laminar y se procedió a sembrar en placas de PCA (Agar Plate Count).

Para una siembra directa se pipetearon 100 µL del tubo a la placa y se repartieron mediante un asa de siembra, finalizada la tarea se le dio la vuelta a la placa.

Se requirió el uso de Eppendorf para posibilitar las diluciones en el cultivo de *E.coli*. Las diluciones fueron necesarias para posibilitar los recuentos de supervivientes, sobre todo en los tubos con menor tiempo de tratamiento, ya que siembras directas en estos casos imposibilitarían las lecturas por excesivo crecimiento.

Para el tiempo inicial, las diluciones empleadas fueron  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M, para el resto de los tiempos de tratamiento  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  M. Los Eppendorf fueron llenados con 1,8 mL de agua destilada esterilizada. El procedimiento de las diluciones fue pipetear 200 µL del tubo tratado a un Eppendorf sin contaminar. Se agitó adecuadamente y se pipetearon 100 µL de este a la placa correspondiente.

Cuando la dilución fue superior del orden de  $10^{-1}$  M, del primer Eppendorff se pipetearon otros 200  $\mu$ L a otro y así sucesivamente hasta llegar a la dilución deseada para que a partir de esta se pudiesen pipetear 100  $\mu$ L a la placa correspondiente.

Las Placas se incubaron durante 24 horas en estufa a 37°C, posteriormente se realizó el recuento de las colonias. En muchos casos las colonias fueron fácilmente visibles y de un tamaño considerable, pero cuando el crecimiento fue elevado como en el caso del tiempo inicial, fue necesario el uso de un contador digital de colonias.

Los resultados fueron expresados como  $\log_{10}(N/N_0)$  frente al tiempo, donde  $N_0$  es el número de células microbianas en las condiciones iniciales y  $N$  es el número de células en la muestra después de diferentes tiempos de tratamiento.



*Fig.2.5:* Estufa VACIOTEM-T, Modelo 400148

### **2.3 Tratamientos aplicados a las muestras de leche.**

Una vez la muestra fue contaminada con la bacteria, se homogenizó adecuadamente y se pipetearon 2 mL a todos los tubos de vidrio requeridos para el tratamiento, los cuales tenían unas dimensiones de 0,7 cm de diámetro y 6,8 cm de altura. Para determinar la cinética de inactivación, cada tubo correspondió a un tiempo de tratamiento. Se utilizaron 15 tubos, pero sólo se trataron 14 ya que el primero correspondía al tiempo inicial. Los tubos fueron puestos en una gradilla para posibilitar ser sumergidos en el agua del baño, lo suficiente para que el volumen de leche quedara sumergido, pero no en su totalidad para evitar la entrada de agua en los mismos.

Se realizaron tratamientos térmicos (TT) y tratamientos térmicos asistidos por ultrasonidos (TS) a 75°C durante 30 minutos. Para los dos tipos de tratamiento, hasta los 6 minutos de tratamiento las muestras se extraían cada minuto. A partir de ese momento se extrajeron cada 2 minutos hasta los 16 minutos. Posteriormente a los 20, 25 y 30 minutos. Mediante este muestreo se determinaron las cinéticas de inactivación microbiana bajo las distintas condiciones ensayadas. Es importante mencionar que, en el tubo correspondiente al tiempo inicial (0 minutos), no se realizó el tratamiento. Este tubo se mantuvo en frío, con el objetivo de evitar crecimiento de una posible

contaminación, hasta el momento de la siembra en las placas (PCA), una vez finalizado el tratamiento. Cada uno de los tratamientos se realizaron por triplicado en agua y en los distintos tipos de leche.

### **2.3.1 Tratamiento térmico**

Todos los tratamientos se realizaron en el mismo dispositivo (Fig 2.7), un baño de 22 L de capacidad lleno de agua, de dimensiones 0,20 x 0,34 x 0,33 metros, que tenía acoplados en la base inferior un conjunto de transductores. El baño estaba conectado a un generador de ultrasonidos, aunque éste no estaba encendido en las experiencias de tratamiento térmico. En los tratamientos térmicos se calentó el agua del baño mediante una resistencia Modelo 121 CFOR conectada a un controlador de temperatura (Omron, modelo E5CK de 48 x 48 mm y con sonda PT100) y todo ello ayudado por un calentador (Bunsen, Modelo 1812 N Serie 33546, España). La temperatura empleada para este tipo de tratamientos fue de 75°C.

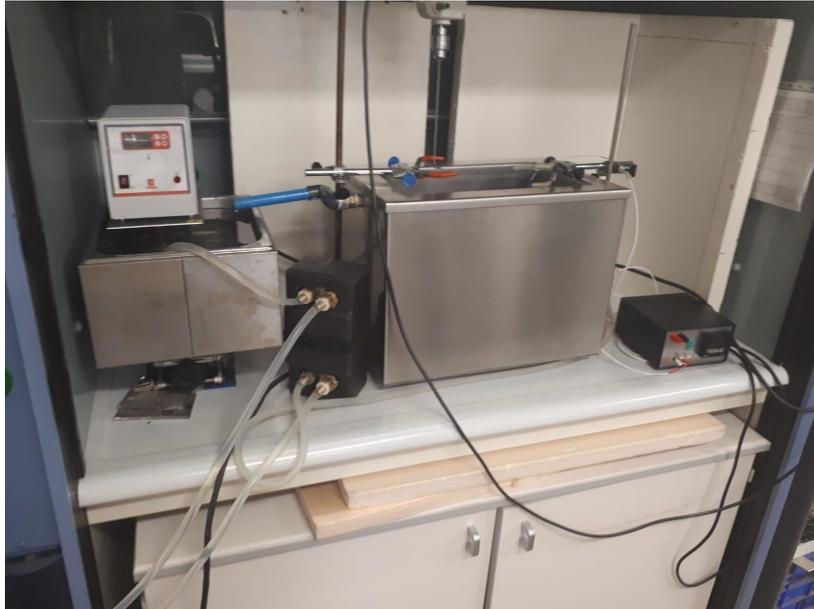
### **2.3.2 Tratamiento de termosonicación**

Para realizar los tratamientos de termosonicación (TS) se utilizó el generador de ultrasonidos anteriormente mencionado (ATU Ultrasonidos, modelo G.A.T-1500, Manises, España). El generador presentaba protecciones ante sobre-corrientes, sobre-tensiones y sobre-calentamiento.

Generaba una onda de frecuencia a partir de energía eléctrica (programada de fábrica, 40 kHz). Disponía de un sistema con barrido de frecuencias configurable para limitar los efectos de aparición de un campo estacionario con zonas de máxima y mínima presión acústica. Estaba compuesto por dos bloques principales: un circuito de control, mediante el cual se pudo visualizar la intensidad y el nivel de potencia de salida; y un circuito de potencia, permitiendo modular la potencia de ultrasonidos. La potencia a la cual trabajamos fue la máxima, 550 W, que fue medida mediante un medidor de potencia digital (Modelo WT210, Yokogawa Electric Corporation, Japón; Fig 2.6)



**Fig.2.6:** Medidor de Potencial digital, Yokogawa, Modelo WT210



**Fig.2.7:** Baño de tratamiento

Los transductores acoplados a la base del baño, cuando reciben la señal eléctrica de alta frecuencia producida por el generador de ultrasonidos, vibran, y de este modo, emiten una onda ultrasónica en dirección perpendicular a la base.

Mediante una gradilla conseguimos sumergir los tubos con las muestras de leche en el baño, en posición perpendicular a la dirección de la onda ultrasónica. De esta manera, se favorece que la onda alcance la máxima superficie posible de la muestra. Gracias a los ultrasonidos, se genera el fenómeno de cavitación. Este consiste en la formación, crecimiento y colapso de microburbujas en el seno del líquido.

Las condiciones de tratamiento fueron; una temperatura de 75°C y una potencia de 550 W. También se realizaron tratamientos de TS para leche entera a 70 y 80°C a la misma potencia (Fig. 2.1). Los tiempos de tratamiento fueron de 30 minutos.

## **2.4 Análisis de proteína y grasa**

Se realizaron análisis del contenido en proteína y grasa antes de los tratamientos, en los diferentes tipos de muestras de leche, según Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas (2007).

Mediante estos análisis se pretendía verificar los contenidos indicados en el etiquetado y comprobar que los porcentajes de las mezclas obtenidas eran correctos y que el contenido en proteína no variaba significativamente al modificar el porcentaje graso.

Por cada tipo de leche los análisis se realizaron por triplicado.

El método de referencia para la determinación de la proteína de la leche es el método Kjeldahl (norma UNE-EN ISO 8968-1:2001). El método Kjeldhal consiste en digerir una cantidad conocida de leche con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y sulfato de potasio, utilizando sulfato de cobre (II) como catalizador, esto es así para que el nitrógeno orgánico presente en la muestra se transforme en sulfato amónico.

El producto de la digestión se alcalinizó con hidróxido de sodio en exceso para liberar amoníaco, que se destiló sobre una solución de ácido bórico con un indicador característico, Shiro-Tashiro, para después valorarla con una solución de ácido clorhídrico de normalidad conocida.

Los resultados del método Kjeldahl se obtuvieron calculando el porcentaje de nitrógeno (Ec.3) y posteriormente el porcentaje de proteínas (Ec.4).

$$\%N = \frac{V \times N \times 14 \times 100}{m (g)} \quad (\text{Ec.3})$$

$$\%P = \%N \times 6,38 \quad (\text{Ec.4})$$

Dónde;

%N= Porcentaje de nitrógeno.

%P= Porcentaje de proteína.

N= Normalidad del ácido de la valoración (equivalentes soluto /Litro disolución).

V= Volumen del ácido consumido (L).

m= Masa de la muestra (g)

Los resultados de los análisis de proteína de las distintas muestras de leche se determinaron midiendo el volumen de muestra empleado (5ml) y teniendo en cuenta las densidades de cada tipo de leche, ya que para realizar los cálculos anteriores necesitábamos conocer la masa de la muestra. La normalidad del ácido valorante empleado fue de 0,1.

La determinación de la grasa se realizó mediante el método Gerber. Este método consiste en tratar un volumen determinado de leche en un butirómetro con ácido sulfúrico para digerir la fracción proteica y los hidratos de carbono de la leche, además de alcohol isoamílico, para romper el estado globular de la grasa y separarla por centrifugación del resto de componentes. Para ello se atemperaron y homogeneizaron las muestras de leche, dosificamos en el interior del butirómetro con sumo cuidado y procurando no mojar el cuello 10 mL de ácido sulfúrico, posteriormente mantuvimos el butirómetro en posición vertical y añadimos 11 mL de leche descansando la pipeta en la pared interna del butirómetro y formando con esta un ángulo de 45° para evitar que la leche y el ácido se mezclaran. Finalmente dosificamos 1 mL de alcohol isoamílico de la misma manera y sin mojar el cuello del butirómetro. El objetivo de esto fue que pudiésemos observar tres capas totalmente diferenciadas (ácido, leche y alcohol). El siguiente paso fue tapar el butirómetro, lo agitamos y lo invertimos rápidamente para mezclar totalmente el contenido. Seguidamente, con el butirómetro con el tapón hacia abajo, lo introducimos en un baño de agua a 65°C durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo, con sumo cuidado, sacamos el butirómetro del baño y lo llevamos a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Para finalizar, volvimos a calentarlo en el baño de la misma manera otros 5 minutos y procedimos a su lectura, ajustamos el tapón de manera que la base de la columna de grasa coincidiera con una de las marcas principales de la escala de lectura, el valor del contenido en grasa fue el valor coincidente con el punto

más bajo del menisco en la parte superior de la columna de grasa. Durante la lectura tuvimos que mantener el butirómetro en posición vertical descansando sobre una superficie rígida y los puntos de lectura a la altura de los ojos.

## **2.5 Otros parámetros fisicoquímicos**

En la investigación realizamos análisis de pH, acidez, densidad y color en las muestras de leche antes y después de los tratamientos.

Se realizaron estos análisis dado que Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas (2007) ya reportaron algunas variaciones en estas propiedades tras un tratamiento de termosonicación.

Para asegurar una significación estadística se midió cada parámetro por triplicado, tanto antes como después del tratamiento.

### **2.5.1 pH y acidez**

Para realizar las mediciones de pH se utilizó un pH-metro (Fig.2.8 pH-metro; VWR International Eurolab S.L, Modelo IS 2000L, Barcelona, España), se sumerge el electrodo del pH-metro, previamente calibrado, en la muestra de leche que se habrá puesto previamente en un vaso de precipitados y se lee directamente el valor de pH.

Para la determinación de la acidez se siguió el método oficial de determinación de acidez en leche, donde se utilizó una bureta, un matraz Erlenmeyer, pipetas de 10 ml, NaOH 0,1 N y el indicador de solución alcohólica, fenolftaleína al 1%. Se realizó una valoración de 9ml de la muestra de leche con NaOH agregando unas gotas del indicador fenolftaleína. El cálculo del (%) de acidez se realizó según la ecuación 5.

$$Acidez (\%) = \frac{ml\ NaOH}{ml\ muestra} \times Factor \quad (Ec.5)$$

El cálculo del Factor se llevó a cabo mediante la ecuación 6, pero previamente se determinó la Normalidad experimental del reactivo NaOH, ya que la Normalidad teórica era conocida.

$$NE = NT \times Factor \quad (Ec.6)$$

Para calcular esta normalidad se realizaron tres valoraciones de NaOH sobre ácido oxálico ( $C_2O_4H_2$ ) con un peso molecular de 126,07 g/mol en su forma hidratada y 90 g/mol estando no hidratado. Por tanto, en cada valoración supusimos que consumimos un volumen determinado de hidróxido de sodio y pudimos calcular un peso del ácido oxálico hidratado gracias a la ecuación 7. Sabiendo que la pureza del oxálico era del 99,5% mediante la regla de proporción conseguimos determinar qué cantidad pesar para obtener una pureza del 100%. Secamos las cantidades calculadas de oxálico para posteriormente diluirlo en agua destilada y valorar con NaOH.

Mediante la ecuación 7 conseguimos determinar la Normalidad experimental de la base valorante (NaOH) por cada valoración y realizamos una media para obtener el resultado final.

$$V \times N = \frac{g}{\frac{PM}{val}} \quad (\text{Ec.7})$$

V= Volumen de NaOH consumidos.

N= Normalidad de NaOH.

g= Peso (g) de ácido oxálico.

PM= peso molecular (g/mol) del ácido oxálico

val= Valencia de ácido oxálico.

Para el cálculo de la masa a pesar de oxálico, el volumen empleado (L) fue el supuesto, la Normalidad fue la teórica, el PM fue el del ácido oxálico hidratado porque lo disponíamos de esta forma en el laboratorio y la valencia en este estado fue 2. Finalmente, para el cálculo de la Normalidad experimental, el volumen representó los litros consumidos de NaOH en la valoración, los gramos fueron los anteriormente calculados con 100% de pureza, el PM fue el correspondiente a la forma no hidratada del ácido oxálico y la valencia en este estado fue 1.

Se dio por terminada todas las valoraciones cuando apareció una coloración rosa persistente, fácilmente perceptible por comparación con un testigo tomado de la misma muestra. Se anotó siempre el volumen de NaOH utilizados en las valoraciones.



**Figura 2.8:** pH-metro; VWR, Modelo IS 2000L

## 2.5.2 Densidad

Para la medición de la densidad en productos líquidos, como la leche, hay que medir con suficiente precisión el volumen que ocupa una determinada cantidad del líquido. Para nuestras mediciones utilizamos un aerómetro particular, el Lactodensímetro Quevenne 15-40° 20°C (Fig.2.9 Lactodensímetro Quevenne; Proton, Modelo 28603, Barcelona, España). El principio de funcionamiento es el siguiente; cualquier cuerpo parcial o totalmente sumergido se ve sometido a dos fuerzas de sentido contrario: el peso y el empuje. Cuando se queda en una posición de equilibrio, el peso será igual al empuje (principio de flotación).

Por otra parte, según el principio de Arquímedes, todo cuerpo sumergido en un fluido experimenta un empuje igual al peso del volumen del fluido que se ha desplazado.

Así pues, el Lactodensímetro se colocó dentro del fluido y se dejó que alcanzase la posición de equilibrio, el volumen del líquido desplazado por el aerómetro fue  $(A \cdot x + V)$ . El peso del líquido desplazado por el principio de Arquímedes es igual al empuje y éste último por el principio de flotación igual al peso del aerómetro.

Por tanto, se cumple (Ec.8):

$$p = W / (A \cdot x + V). \quad (\text{Ec.8})$$

Dónde;

$p$  = Densidad ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

$W$  = Peso del aerómetro (kg)

$A$  = Sección de la varilla ( $\text{m}^2$ )

$x$  = Distancia a la cual queda sumergida la varilla (m)

$V$  = Volumen del bulbo del aerómetro ( $\text{m}^3$ )

La distancia  $x$  puede hacerse corresponder con una escala que proporcione directamente valores de densidad, como en nuestro caso la escala Quevenne. Será muy importante controlar bien la temperatura de la leche con un termómetro durante la experiencia porque esta modifica la densidad. La temperatura de medición fue la temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ).



**Fig.2.9:** Lactodensímetro Quevenne; Proton Modelo 28603

### 2.5.3 Medida de Color

En nuestro caso, hemos trabajado con el espacio CIE L\*a\*b, sistema cartesiano formado por 3 ejes: un eje vertical (L\*) que representa la medida de luminosidad de un color variando desde 0 para un negro hasta 100 para un blanco, a\* es uno de los dos ejes horizontales y representa una medida del contenido de rojo o de verde de un color. Si un color tiene rojo, a\* será positiva, mientras que si a\* es negativa entonces el color tendrá cierta cantidad de verde. El otro eje horizontal es b\*, perpendicular al eje a\*. Valores positivos de b\* indican contenido en amarillo, mientras que valores negativos indican contenido de azul.

Para apreciar diferencias en el color percibido se utiliza la ecuación 9, donde los incrementos representan la diferencia entre los valores del parámetro antes y después del tratamiento.

$$\Delta E = \sqrt{([\Delta a^*])^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (\text{Ec.9})$$

Las diferencias en el color pueden ser clasificadas como muy diferente ( $\Delta E > 3$ ), diferente ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) y ligeramente diferente ( $\Delta E < 1,5$ ) (Tiwari y col., 2008).

Se utilizó un espectrofotómetro Konica Minolta (Fig.2.10 Espectrofotómetro CM-2500d, Japón), con unas condiciones de Iluminante D65 y Observador 10°. El observador 10° es un intento de estandarizar la respuesta del ojo para un observador medio, utilizado para la práctica industrial, ya que el observador 2° tenía el inconveniente de que sólo era aplicable a campos visuales concretos.

Cuando realizamos las medidas, en primer lugar, se calibró el espectrofotómetro, llenamos unas placas de vidrio con las muestras, las tapamos y realizamos la lectura sobre la superficie del vidrio tratando que entre el vidrio y el líquido no quedase aire.



**Fig.2.10:** Espectrofotómetro CM-2500d, Fabricado en Japón.

## **2.6 Modelización de la cinética de inactivación microbiana**

Las cinéticas de inactivación se modelizaron matemáticamente con el propósito de predecir el efecto de diferentes tratamientos sin llevar a cabo numerosos experimentos, así como evaluar matemáticamente el efecto de las variables del proceso. Se utilizaron tres modelos que representan cinética de inactivación microbiana.

Los modelos matemáticos empleados fueron no lineales; el modelo de Weibull (Ec. 10), el Peleg tipo B (Ec. 11) y el modelo de Gompertz (Ec.12).

El modelo de Weibull supone que la inactivación microbiana se puede considerar como la ruptura de partículas bajo una tensión mecánica (Peleg, 2006). En la ecuación de Weibull  $b$  es un parámetro no lineal relacionado con la velocidad de inactivación y  $n$  un parámetro que muestra la forma de la curva. Así pues, cuando  $n=1$  la curva de supervivencia es lineal.

Por otra parte, si es diferente de uno puede ser cóncava hacia abajo ( $n>1$ ) o cóncava hacia arriba ( $n<1$ ).

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \times t^n \quad (\text{Ec.10})$$

En el modelo de "Peleg tipo B" el daño acumulado por el proceso de inactivación disminuye la resistencia al tratamiento de los miembros más débiles de la población y, una vez estos se eliminan, el resto se hacen progresivamente más resistentes. Todo esto se refleja en una curva de supervivencia semi-logarítmica que es inicialmente cóncava hacia abajo y cambia a cóncava hacia arriba, conforme avanza el tratamiento. Este tipo de curva se ha descrito en Peleg (2006), siendo  $k_1$ ,  $k_2$  y  $m$  los parámetros del modelo de Peleg tipo B.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{-k_1 \times t^m}{k_2 + t^m} \quad (\text{Ec.11})$$

El modelo de Gompertz fue modificado por Linton y col. (1996) para describir diferentes tipos de curvas de inactivación. Donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son diferentes regiones de la curva de supervivencia.  $A$  representa la fase de latencia,  $B$  la velocidad máxima de inactivación y  $C$  la reducción final de supervivientes.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = C e^{-e^{A+Bt}} - C e^{-e^A} \quad (\text{Ec.12})$$

La identificación de los parámetros se realizó planteando un problema de optimización. Por lo cual, se minimizó el sumatorio de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los valores obtenidos por cada modelo. Se empleó el método del gradiente reducido generalizado (GRG) que se encuentra disponible en la herramienta Solver de Microsoft Excel.

Los ajustes de los modelos se llevaron a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation Redmond Washington, USA). Además, se calculó el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) y la raíz del error medio cuadrático (RMSE) para estimar la precisión de los modelos matemáticos (Ec. 13 y 14).

$$R^2 = 1 - \frac{S_{yx}^2}{S_y^2} \quad (\text{Ec.13})$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^z (y_k - y_{k*})^2}{z}} \quad (\text{Ec.14})$$

Dónde  $y_k$  e  $y_{k*}$  son los valores experimentales y los estimados respectivamente, calculados como  $\log_{10}(N/N_0)$  para *E.coli* CECT 101. Por otra parte,  $z$  es el número de valores experimentales,  $S_y$  y  $S_{yx}$  son la desviación estándar total y la desviación estándar de la estimación, respectivamente.

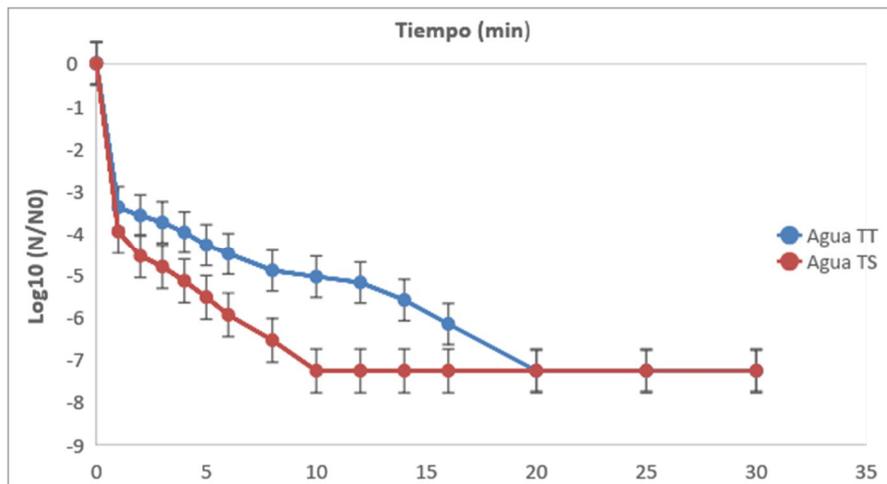
## 2.7 Análisis estadísticos

Para estudiar las características fisicoquímicas antes y después del tratamiento térmico se realizaron comparaciones de medias, obteniéndose intervalos de confianza para la media y la varianza de la población, así como el contraste de hipótesis sobre el valor de la media, utilizando la distribución t de Student. También se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA multivariante) para evaluar el efecto de varios factores (tiempo, tipo de tratamiento, tipo de muestra y la temperatura) sobre la inactivación microbiana de los distintos tratamientos llevados a cabo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp. 5.1, Warrenton, USA).

## **3. Resultados y discusión**

### 3.1 Tratamientos de inactivación en agua. Efecto de los ultrasonidos

En la Figura 3.1 se representan las cinéticas de reducción microbiana para cada uno de los tratamientos que se llevaron a cabo (tratamiento térmico y tratamiento térmico asistido por ultrasonidos) empleando agua como medio de tratamiento. Cabe destacar que los valores de desviación estándar obtenidos fueron bastante bajos, lo que demuestra repetitividad de las experiencias.



**Fig.3.1:** Valores experimentales de la reducción media de microorganismos a diferentes tiempos de tratamiento para agua a 75°C.

En base a los resultados obtenidos (Fig. 3.1), se puede decir que el empleo de ultrasonidos de potencia acelera significativamente la inactivación microbiana.

La población bacteriana de las muestras de agua tratada únicamente mediante calor sufrió una reducción de 3,39 ciclos-log durante el primer minuto, mientras que cuando se realizó el tratamiento asistido mediante ultrasonidos, la reducción fue de 3,97 ciclos-log.

Al alcanzar los cuatro minutos de tratamiento, se consiguió reducir hasta 3,98 ciclos-log la población microbiana tratada con calor.

Por otra parte, para el mismo tiempo, con el tratamiento asistido por ultrasonidos, se alcanzó una reducción de 5,15 ciclos-log, es decir, 1,17 ciclos-log más que sin el empleo de ultrasonidos.

Según indica Zhu y col. (2017) en la inactivación de *E. coli* O157:H7 mediante termosonicación, la inactivación puede ser debida a la degeneración de las proteínas intracelulares y los cambios en la permeabilidad de la membrana de celular. Por otra parte, el empleo de ultrasonidos y, por tanto, el fenómeno de cavitación produce alteraciones en la integridad de la membrana lo que puede conducir a la rotura de esta y a la pérdida de la viabilidad del microorganismo. Por tanto, la termosonicación debilita a la bacteria sustancialmente más que sólo el empleo de calor. Además, la aplicación de ultrasonidos mejora los coeficientes de transferencia de calor, facilitando que la acción térmica llegue antes a los componentes termosensibles del microorganismo.

Cabe mencionar que la U. S Food and Drug Administration establece la directriz de alcanzar una reducción en *E.coli* O157:H7 de 5 ciclos-log (Zhu y col., 2017). En nuestro caso, utilizamos una cepa distinta. Pese a ello, sí podemos afirmar que alcanzamos esta reducción logarítmica en muy poco tiempo con el empleo de ultrasonidos (5 minutos para leche desnatada, 6 minutos para la mezcla de 1% materia grasa y 8 minutos para la mezcla de 2% materia grasa y leche entera). Una reducción notable en el tiempo de tratamiento en comparación al tratamiento térmico (14 minutos para leche desnatada, 16 minutos para las mezclas de 1 y 2% materia grasa y 20 minutos para la leche entera).

Para empresas de la alimentación la reducción de tiempos de tratamiento supone grandes beneficios, ya que disminuir el tiempo de tratamiento representa un ahorro energético y consecuentemente un menor gasto económico.

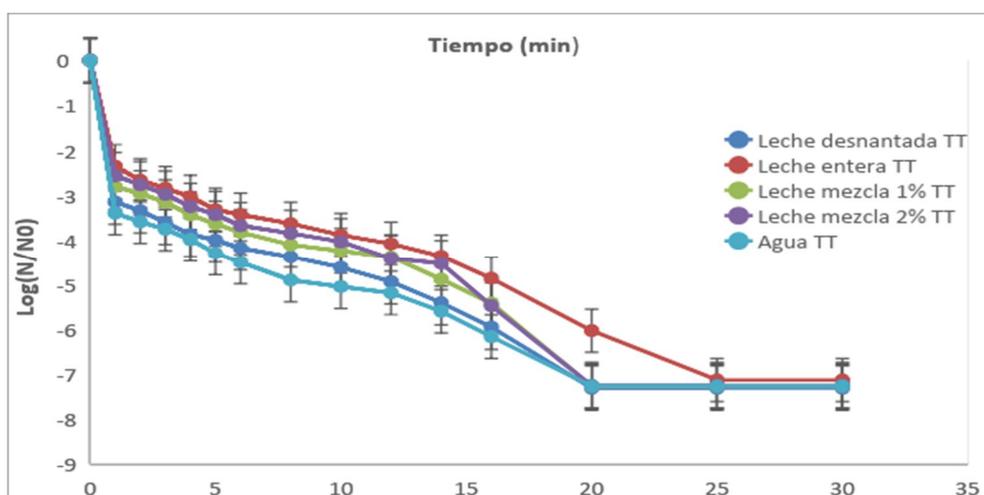
La inactivación total (no creció ninguna colonia después de la siembra) en el tratamiento térmico asistido por ultrasonidos se produjo a los 10 minutos mientras que en el que se emplea únicamente calor se necesitaron 20 minutos, esto es el doble de tiempo.

Se realizó una comparación de medias mediante una prueba t de Student para tiempos concretos en los tratamientos y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el ratio de inactivación de *E.coli* CECT 101 en agua con (TT) y agua con (TS) ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Inactivación de *E.coli* CECT 101 en diferentes tipos de leche

#### 3.2.1 Tratamiento térmico en distintos tipos de leche

En la Figura 3.2 se representan las cinéticas de reducción microbiana para cada uno de los tratamientos térmicos que se llevaron a cabo en los distintos tipos de leche, junto con el tratamiento térmico realizado al agua.



**Fig.3.2:** Valores experimentales de la reducción media de microorganismos en distintos tipos de leche y en agua a diferentes tiempos de tratamiento térmico a 75°C.

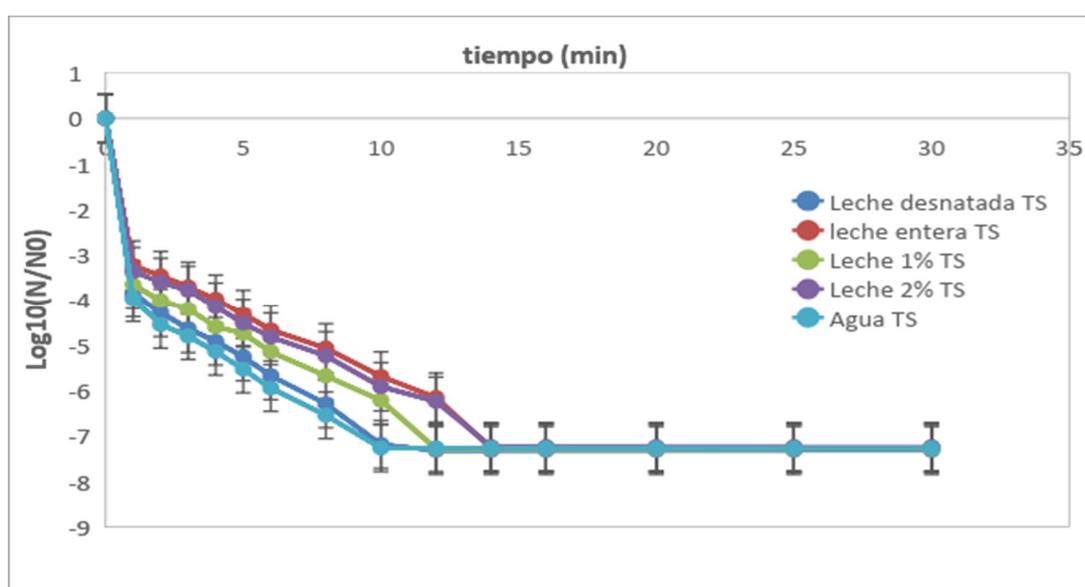
Atendiendo a los resultados (Fig. 3.2) se aprecia una mayor resistencia térmica conforme aumenta el porcentaje graso. Parece ser que las curvas de inactivación pueden estar divididas en dos secciones, una primera con una rápida reducción inicial y una segunda sección con una reducción más lenta. Esto puede ser debido a la distinta sensibilidad de las células al tratamiento (Lee y col., 2009). A los 5 minutos de tratamiento se consiguió una reducción de la población microbiana de 4 ciclos-log en la leche desnatada, mientras que para la leche entera fue de 3,32 ciclos-log. Es decir, 0,68 ciclos-log menos. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). En cuanto a las mezclas de 1% y 2%, para este tiempo de tratamiento las diferencias también

fueron significativas ( $p < 0,05$ ). Para la mezcla de 1% la reducción fue de -3,66 ciclos-log mientras que para la mezcla de 2%, -3,42 ciclos-log.

Para la leche desnatada, el agua y las mezclas, la inactivación total se consigue a los 20 minutos. Con la leche entera hubo que esperar hasta los 25 minutos para alcanzar la inactivación total.

### 3.2.2 Tratamiento térmico asistido por ultrasonidos en distintos tipos de leche.

En la Fig.3.3 se representan las cinéticas de reducción microbiana para cada uno de los tratamientos térmicos asistidos mediante ultrasonidos que se llevaron a cabo en los distintos tipos de leche.



**Fig.3.3:** Valores experimentales de la reducción media de microorganismos en distintos tipos de leche y en agua a diferentes tiempos de tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos a 75°C.

Se observa por tanto que la grasa realiza una función de barrera, además otros factores que afectan a la resistencia térmica por parte de las bacterias son el contenido en proteína o sólidos totales del medio (Gaze, 2005). En el caso de la leche entera, existe un mayor número de glóbulos grasos con tamaño medio (4 $\mu$ m). La bacteria puede adherirse a esos glóbulos grasos pero los ultrasonidos tienen la capacidad de romper la membrana lipídica de estos glóbulos grasos, generando otros de menor tamaño. Algunos de estos pequeños glóbulos aparecen como esferas huecas con una superficie rugosa (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2006).

En comparación a las experiencias anteriores, parece ser notable el efecto de los ultrasonidos, ya que la inactivación se produce en un menor tiempo. Para la leche más resistente, la leche entera, la inactivación mediante TT se conseguía a los 25 minutos y con el empleo de ultrasonidos (TS) a los 14 minutos. También es observable el efecto protector de la grasa en termosonicación ya que, a los cinco minutos, para leche

desnatada, se consigue una reducción de 5,26 ciclos-log, mientras que para la leche entera es de 4,32.

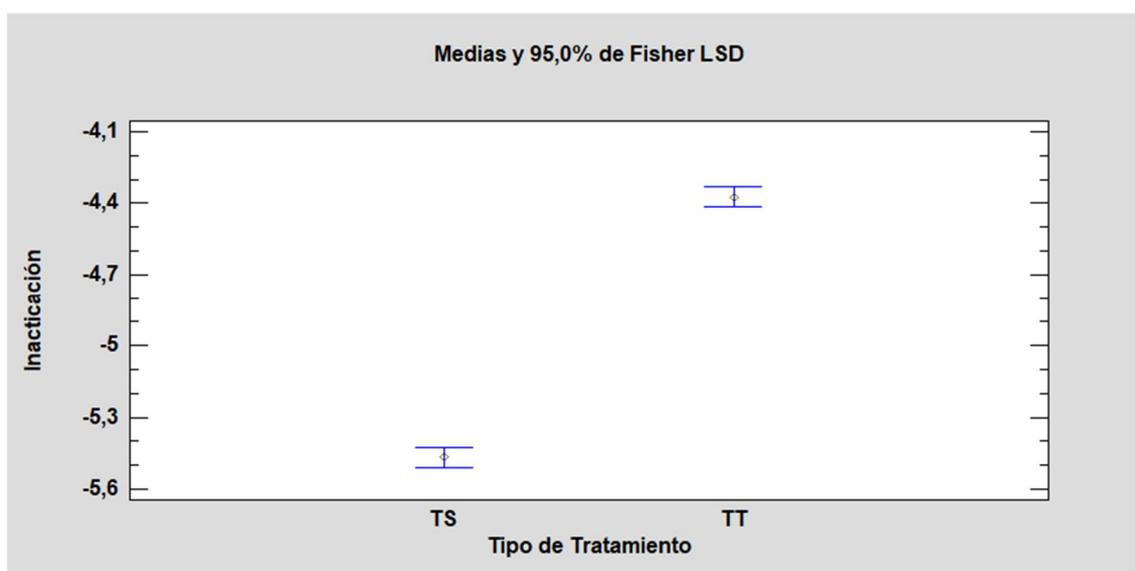
La inactivación total se consigue a los diez minutos en el agua y la leche desnatada, en la mezcla de 1% grasa a los doce minutos y la mezcla de 2% grasa y leche entera a los catorce minutos, tiempos todos ellos menores a los necesarios para conseguir el mismo efecto en el tratamiento térmico (Figura 3.2.).

Otros autores (Piyasena y col., 2003) también observaron que el efecto de combinar calor con sonicación para la inactivación microbiana era más efectivo que el calor.

Además, los resultados concuerdan con otros estudios, ya que en tratamientos de ultrasonidos en combinación con calor, los tiempos para alcanzar una reducción de 5 log en poblaciones de *E.coli* fueron de 4 a 6 minutos (D'amico y col., 2006; Ugarte-Romero y col., 2006). En este estudio se necesitaron 5 minutos para alcanzar dicha reducción en leche desnatada, 6 para la mezcla de 1% y 8 minutos para la leche entera y la mezcla de 2% grasa. Cabe destacar que las variaciones pueden deberse al tipo de cepa de *E.coli*, el tipo de alimento empleado, así como a las condiciones de trabajo.

Se realizó un ANOVA multivariante para analizar el efecto del tipo de muestra (contenido graso), el tiempo y el tipo de tratamiento (TT o TS) en la inactivación de *E.coli* CECT 101, en todas las experiencias realizadas. Los resultados mostraron que los 3 factores tuvieron unos p-value menores de 0.05, por tanto, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la inactivación microbiana con un 95% de nivel de confianza. Además, no existieron interacciones de dos factores en el modelo.

En las siguientes figuras se muestran las pruebas de Múltiple Rango para la inactivación de *E.coli* CECT 101 por tipo de tratamiento (Fig.3.4) y por tipo de muestra (Fig.3.5).



**Fig.3.4:** Prueba de Múltiple Rango para la inactivación de *E.coli* CECT101 por tipo de tratamiento.

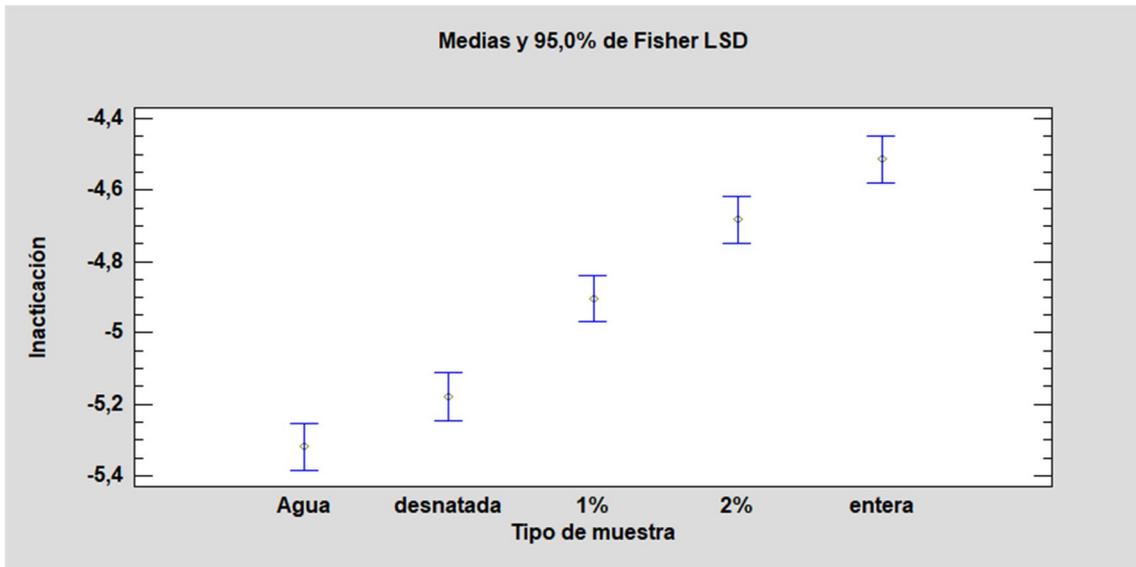


Fig.3.5: Prueba de Múltiple Rango para la inactivación de *E.coli* CECT101 por tipo de muestra.

Observando los resultados obtenidos, podemos decir que tanto el tipo de tratamiento empleado como el tipo de muestra afectaron a la inactivación de la bacteria. La termosonicación potencia la inactivación (Fig.3.4) encontrándose un valor medio de 4,35 ciclos-log para los TT y de 5,45 ciclos-log para los tratamientos de TS. Por otra parte, se observa cómo al aumentar el contenido en grasa de las muestras se reduce la inactivación de la bacteria *E.coli* CECT 101 (Fig.3.5), siendo los valores medios de 5,3 ciclos-log para agua, 5,15 ciclos-log para leche desnatada, 4,9 ciclos-log para la mezcla de 1%, 4,65 ciclos-log para la mezcla de 2% y 4,45 ciclos-log para la leche entera.

### 3.2.3 Tratamiento térmico asistido por ultrasonidos en leche entera.

#### Efecto de la temperatura.

Los resultados obtenidos muestran que la leche entera presenta mayor resistencia a la inactivación de *E.coli*. Por este motivo se realizaron tratamientos de termosonicación a distintas temperaturas: 70, 75 y 80°C.

En la Fig.3.6 se representan las cinéticas de reducción microbiana para cada uno de los tratamientos de termosonicación realizados en leche entera.

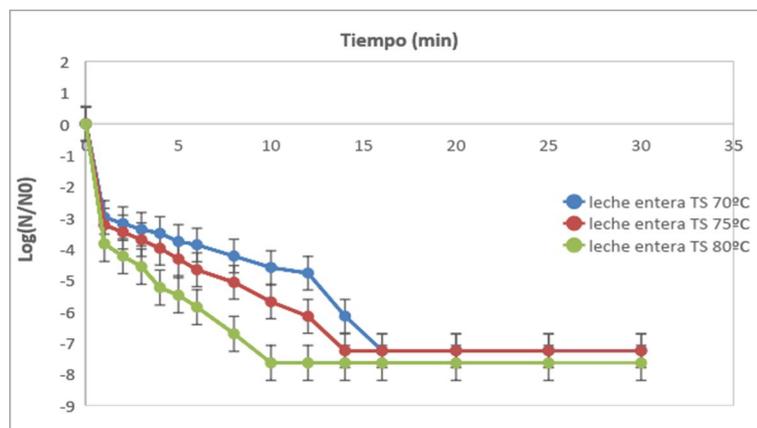


Fig.3.6: Valores experimentales de la reducción media de microorganismos en leche entera a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos

Tal y como se puede apreciar, al aumentar la temperatura, los tiempos para alcanzar la reducción de 5-log requerida por la FDA (Food and Drug Administration) se reducen.

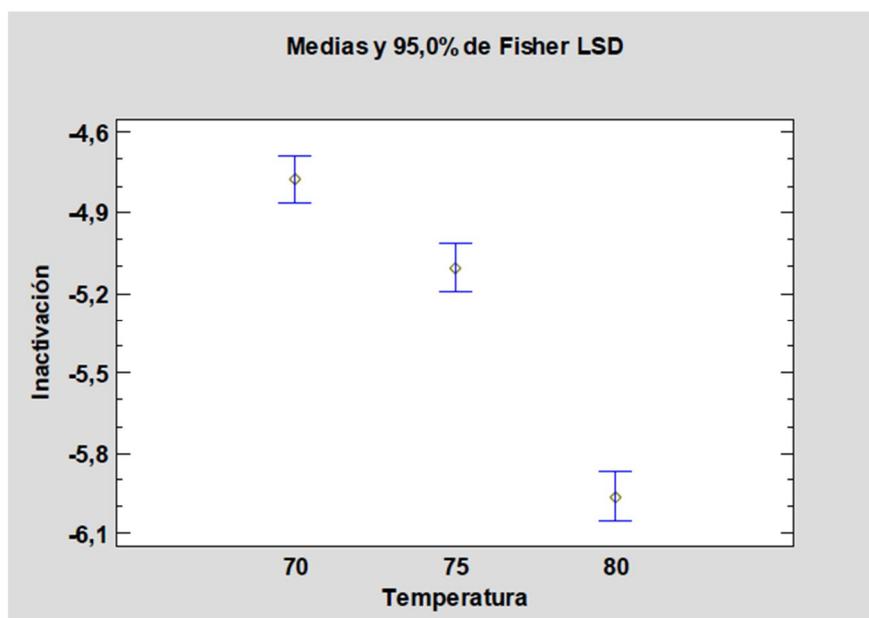
Si la termosonicación se combinase con presión, la reducción sería todavía más drástica. Lee y col. (2009) encontraron que la combinación de estos factores letales, acorta significativamente el tiempo requerido para alcanzar una reducción 5-log en una población de *E.coli* K12.

A los 5 minutos de tratamiento a 70°C se produce una reducción de 3,76 ciclos-log en la población microbiana, mientras que para 75 y 80°C de 4,32 y 5,48 ciclos-log respectivamente.

Todas presentan entre ellas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). La total inactivación se produce a los 16, 14 y 10 minutos para las temperaturas 70, 75 y 80°C, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto la influencia de la temperatura en los tratamientos de termosonicación.

Para estas experiencias de leche entera tratadas por termosonicación a distintas temperaturas también se realizó un ANOVA Multivariante para analizar el efecto del tiempo y la temperatura en la inactivación de *E.coli* CECT 101. Los resultados mostraron que los 2 factores tuvieron unos p-value menores de 0.05, por tanto, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la inactivación microbiana con un 95% de nivel de confianza. Además, no existen interacciones de dos factores en el modelo.

En la siguientes figuras se muestran la prueba de Múltiple Rango para la inactivación de *E.coli* CECT 101 en leche entera tratada por termosonicación con diferentes temperaturas (Fig.3.7).



**Fig.3.7:** Prueba de Múltiple Rango para la inactivación de *E.coli* CECT 101 en leche entera tratada por termosonicación mediante distintas temperaturas.

La temperatura fue un factor influyente en la inactivación microbiana y según podemos observar en la Fig 3.7, el ratio de inactivación aumentó al aumentar temperatura en los tratamientos de leche entera por termosonicación pasando de un valor medio de 4,75 ciclos-log a 70°C a 5,95 ciclos-log a 80°C.

### 3.3 Modelización matemática de la inactivación microbiana.

Las tablas 1, 2 y 3 muestran los parámetros del modelo y los parámetros estadísticos obtenidos en el ajuste de los modelos de Weibull (tabla 1), Peleg tipo B (tabla 2) y Gompertz (tabla 3), a los datos experimentales.

**Tabla 1:** Parámetros medios (modelo y estadísticos) del Modelo de Weibull

Tratamiento	Modelo de Weibull			
	b	n	R <sup>2</sup>	RMSE
Agua TT	2,78	0,29	0,97	0,32
Agua TS	4,19	0,19	0,96	0,39
Desnatada TT	2,44	0,32	0,95	0,40
Desnatada TS	3,92	0,21	0,89	0,41
Mezcla 1% TT	2,04	0,37	0,93	0,47
Mezcla 1% TS	3,46	0,24	0,95	0,41
Mezcla 2% TT	1,78	0,41	0,93	0,50
Mezcla 2% TS	2,89	0,31	0,97	0,32
Entera TT	1,65	0,42	0,99	0,42
Entera TS	2,85	0,30	0,95	0,41
Entera TS 70°C	2,23	0,36	0,93	0,52
Entera TS 80°C	3,98	0,22	0,99	0,48
Promedio			0,95	0,42

En base a los resultados obtenidos en la tabla 1, siendo b un parámetro relacionado con la velocidad de inactivación y n con la forma de la curva, se observa que, con el empleo de ultrasonidos aumentan los valores de b y disminuyen los de n.

El incremento de temperatura también provoca un aumento de b y una disminución de n. Por otro lado, la disminución de los valores de b y el aumento de n puede relacionarse también con el incremento del porcentaje graso. El modelo se ajusta bien a los datos experimentales ya que todos los valores de R<sup>2</sup> son mayores de 0,88 y los valores medios de RMSE menores de 0,53.

**Tabla 2:** Parámetros medios (modelo y estadísticos) del Modelo de Peleg tipo B.

Tratamiento	Modelo de Peleg tipo B				
	k1	k2	m	R <sup>2</sup>	RMSE
Agua TT	12355,23	4475,40	0,29	0,97	0,32
Agua TS	10,53	1,83	0,49	0,97	0,32
Desnatada TT	11583,66	4736,63	0,32	0,95	0,40
Desnatada TS	9,61	1,83	0,60	0,96	0,34
Mezcla 1% TT	10286,91	5052,88	0,37	0,93	0,47
Mezcla 1% TS	12,54	2,98	0,47	0,96	0,39
Mezcla 2% TT	9592,10	5375,98	0,41	0,93	0,50
Mezcla 2% TS	16,41	4,84	0,43	0,96	0,37
Entera TT	9384,96	5685,27	0,42	0,94	0,42
Entera TS	345,10	120,38	0,30	0,99	0,41
Entera TS 70°C	160,00	72,95	0,38	0,93	0,52
Entera TS 80°C	9,58	1,93	0,69	1,00	0,38
Promedio				0,96	0,40

Siendo k1, k2 y m los parámetros en el modelo de Peleg tipo B, en la tabla 2 se observa que los parámetros k1 y k2 disminuyen con el empleo de ultrasonidos y m aumenta con el empleo de éstos excepto en leche entera. Con el incremento del porcentaje graso, los valores de k1 aumentan con el empleo de ultrasonidos y disminuyen para el tratamiento térmico. En cambio, aumentando también el porcentaje graso los valores de k2 aumentan con los dos tipos de tratamiento y los valores de m aumentan para el tratamiento térmico, pero se reducen al aplicar ultrasonidos. Para los tratamientos de termosonicación en leche entera a distintas temperaturas, los valores de k1 y k2 son mayores para 75°C y menores para 80°C, teniendo a 70°C valores intermedios. Con los valores de m pasa a la inversa, son menores para 75°C y mayores para 80°C.

**Tabla 3:** Parámetros medios (modelo y estadísticos) del Modelo de Gompertz

Tratamiento	Modelo de Gompertz				
	A	B	C	R <sup>2</sup>	RMSE
Agua TT	2,76	0,02	44394616,80	0,77	0,84
Agua TS	2,53	0,03	2127355,37	0,91	0,56
Desnatada TT	2,76	0,01	47506054,22	0,75	0,89
Desnatada TS	1,56	0,07	815,18	0,89	0,64
Mezcla 1% TT	2,76	0,01	48157044,84	0,76	0,89
Mezcla 1% TS	2,57	0,02	3245919,17	0,87	0,68
Mezcla 2% TT	2,76	0,01	47829871,89	0,78	0,86
Mezcla 2% TS	2,57	0,02	3518318,42	0,88	0,67
Entera TT	2,76	0,01	47597808,27	0,78	0,82
Entera TS	2,56	0,02	3009669,16	0,88	0,68
Entera TS 70°C	2,58	0,01	4045704,11	0,81	0,85
Entera TS 80°C	2,56	0,02	3277262,66	0,92	0,57
Promedio				0,83	0,75

En el modelo de Gompertz, los parámetros A, B y C representan diferentes regiones de la curva de supervivencia. A representa la fase de latencia, B la velocidad máxima de inactivación y C la reducción final de supervivientes. En la tabla 3 se observa que con el empleo de ultrasonidos disminuye A, aumenta B y se reduce C. Es decir, el empleo de ultrasonidos aumenta la velocidad máxima de destrucción, lo que implicaría una mejora en los tratamientos.

Con el incremento del porcentaje graso en los tratamientos térmicos y tratamientos térmicos asistidos mediante ultrasonidos los parámetros se mantienen en valores similares siendo menores para la leche desnatada en el caso del empleo de ultrasonidos.

Esto implica que no proporciona información sobre la influencia del contenido en grasa sobre los tratamientos. En cuanto al efecto de la temperatura en los tratamientos de termosonicación, en leche entera se puede observar que los parámetros A, B y C, para 75 y 80°C, se mantienen parejos, pero a 70°C la fase de latencia es mayor, la velocidad de inactivación menor y la reducción final de supervivientes mayor.

En el conjunto de todas las experiencias, el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el modelo de Peleg tipo B con un valor promedio de  $R^2$  y RMSE de 0,96 y 0,4 respectivamente, seguido del modelo de Weibull con un promedio en  $R^2$  de 0,95 y RMSE de 0,42. En último lugar, el modelo de Gompertz, con valores promedio de  $R^2$  y RMSE de 0,83 y 0,75 respectivamente.

### 3.4 Análisis de proteínas y grasa

En la tabla 4 se muestra el volumen del ácido valorante empleado, el porcentaje de nitrógeno calculado, así como el de proteína en los distintos tipos de leche.

**Tabla 4:** Resultados del método Kjeldahl en leche.

Leche	HCl (mL)	%N	%P
Desnatada	18,97±0,06	0,52±0,00	3,29±0,00
1%	17,70±0,26	0,48±0,01	3,07±0,01
2%	17,34±0,50	0,47±0,01	3,01±0,01
Entera	18,67±0,29	0,51±0,01	3,24±0,01

Los resultados obtenidos son muy similares al contenido proteico en el etiquetado de la leche empleada (3%).

En la tabla 5 se muestra el porcentaje graso obtenido en los distintos tipos de leche por lectura directa del butirómetro.

**Tabla 5:** Resultados de porcentajes grasos en leche.

Leche	% grasa
Desnatada	0,30±0,00
1%	1,03±0,06
2%	2,00±0,00
Entera	3,57±0,06

Como se puede observar, los valores se ajustan a los contenidos proporcionados en el etiquetado de la leche entera (3,6%) y desnatada (0,3%). Además, también se verifica una correcta realización de las mezclas de leche, ya que los resultados obtenidos fueron los porcentajes deseados.

### 3.5. Efecto de los tratamientos sobre las características fisicoquímicas de la leche.

#### 3.5.1 pH y acidez

En las tablas 6 y 7 se muestran los valores de pH y acidez de las distintas muestras de leche antes y después de los tratamientos térmicos (TT) y de los tratamientos térmicos asistidos mediante ultrasonidos (TS).

**Tabla 6:** Valores de pH y acidez en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento a 75°C.

Leche	Antes TT	Después TT	Antes TT	Después TT
	pH	pH	Acidez (%)	Acidez (%)
Desnatada	6,62±0,00	6,62±0,00	0,17±0,01	0,17±0,01
Mezcla 1%	6,47±0,01	6,45±0,02	0,16±0,01	0,16±0,01
Mezcla 2%	6,57±0,00	6,54±0,02	0,16±0,01	0,16±0,01
Entera	6,60±0,02	6,50±0,01	0,17±0,00	0,17±0,01

**Tabla 7:** Valores de pH y acidez en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico asistido por ultrasonidos a 75°C

Leche	Antes TS	Después TS	Antes TS	Después TS
	pH	pH	Acidez (%)	Acidez (%)
Desnatada	6,62±0,00	6,41±0,01	0,17±0,01	0,18±0,01
Mezcla 1%	6,47±0,01	6,33±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01
Mezcla 2%	6,57±0,00	6,38±0,02	0,16±0,01	0,17±0,00
Entera	6,60±0,02	6,25±0,03	0,17±0,00	0,18±0,00

El pH de todas las muestras de leche descendió después de los dos tipos de tratamiento, aumentando la acidez en el caso de los tratamientos por TS.

Realizando una comparación de medias, después del tratamiento térmico a 75°C, sólo resultó significativa la diferencia en el valor de pH de la leche entera (valor-p<0,05). Mientras que después del uso de ultrasonidos todas las variaciones de pH fueron estadísticamente significativas para las diferentes muestras de leche (valor-p<0,05). Comparando los valores de pH de las muestras tratadas por calor y por calor junto con ultrasonidos las diferencias resultaron significativas (valor-p<0,05) en todos los tipos de leche.

Por otra parte, en el caso de la acidez, las diferencias entre antes y después del uso de calor y calor junto a ultrasonidos no fueron significativas (valor-p>0,05), apreciándose que por el uso de ultrasonidos hubo un ligero aumento.

De acuerdo con Walstra y col. (2006), el descenso del pH puede ser debido a la hidrólisis de ésteres fosfóricos debido a la acción enzimática. El aumento de la acidez puede ser debido a la lipólisis, esto es la rotura de triglicéridos a ácidos grasos libres provocado también por la actividad enzimática (Walstra, Wouters & Geurts, 2006). Los ultrasonidos pueden acelerar las reacciones enzimáticas de la leche ya que, al romper los glóbulos grasos, estos están más disponibles para la enzima (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2008). De ahí que el efecto del tratamiento sea mayor en el caso de los tratamientos por termosonicación.

Podría ser que el aumento de la acidez en la leche pudiese estar relacionado con la formación de nitratos y nitritos en agua con aire saturado después de la sonicación. Supeno (2000) realizó un estudio en agua y observó este efecto. No obstante, en ésta no existen todos los compuestos nutricionales de la leche, por lo que se necesitaría más investigación para concretar esta posible causa.

El Código Alimentario Español establece un valor máximo de acidez para la leche de vaca, cabra y burra de 0,2% de ácido láctico. Por tanto, después de los dos tipos de tratamiento todos los tipos de leche eran aptos para el consumo.

### 3.5.2 Densidad.

Los valores de densidad de las muestras de leche antes y después de los tratamientos térmicos (TT) y los tratamientos térmicos asistidos mediante ultrasonidos (TS) a 75°C durante 30 minutos fueron de 1,03 g/cm<sup>3</sup>, no encontrándose ningún efecto de los tratamientos sobre el parámetro densidad.

### 3.5.3 Color

En las tablas 8 y 9 se muestran los estándares de color CIELAB en las distintas muestras de leche antes y después de los tratamientos.

**Tabla 8:** Estándares de color CIELAB en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico a 75°C.

Leche	Antes TT	Después TT	Antes TT	Después TT	Antes TT	Después TT
	L*	L*	a*	a*	b*	b*
Desnatada	77,23± 0,68	79,19± 0,42	-5,37± 0,01	-5,62± 0,01	1,26± 0,03	1,00± 0,05
Mezcla 1%	81,90± 0,32	80,37± 0,03	-4,34± 0,00	-5,03± 0,14	4,070± 0,01	2,12± 0,05
Mezcla 2%	85,68± 0,40	81,26± 0,46	-3,10± 0,01	-4,48± 0,01	5,31± 0,04	3,11± 0,05
Entera	87,59± 0,13	83,82± 0,22	-2,37± 0,01	-3,91± 0,12	5,89± 0,09	4,16± 0,17

**Tabla 9:** Estándares de color CIELAB en las distintas muestras de leche antes y después del tratamiento térmico asistido por ultrasonidos a 75°C.

Leche	Antes TS	Después TS	Antes TS	Después TS	Antes TS	Después TS
	L*	L*	a*	a*	b*	b*
Desnatada	77,23± 0,68	81,04± 0,25	-5,37± 0,01	-5,90± 0,41	1,26± 0,03	1,79± 0,03
Mezcla 1%	81,90± 0,32	81,03± 0,03	-4,34± 0,00	-4,90± 0,03	4,070± 0,01	3,33± 0,01
Mezcla 2%	85,68± 0,40	82,89± 0,09	-3,10± 0,01	-4,39± 0,02	5,31± 0,04	4,52± 0,01
Entera	87,59± 0,13	84,54± 0,22	-2,37± 0,01	-3,69± 0,21	5,89± 0,09	5,97± 0,50

También se realizó una comparación de medias para determinar la significación estadística de estas diferencias

Después del tratamiento térmico a 75°C, para la leche entera tanto L\* como a\* y b\* mostraron diferencias significativas (valor-p<0,05). Para la leche desnatada ocurrió lo mismo. En cuanto a las mezclas de 1% y 2% de materia grasa también aparecieron diferencias significativas (valor-p<0,05).

Después del tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos, para leche entera las diferencias fueron significativas en los valores de L\* y a\* (valor-p<0,05). En cambio, para b\*, las diferencias no fueron significativas (p>0.05).

Para la leche desnatada las diferencias fueron significativas para L\* y b\*(valor-p<0,05) pero no para a\*.

En cuanto a las mezclas todas las diferencias en los estándares de color antes y después del uso de ultrasonidos fueron significativas (valor-p<0,05).

El color presentó notables variaciones antes y después de la realización de los tratamientos. El estándar de color L\* aumentó sólo en la leche desnatada, es decir, sólo en este caso aumentó su luminosidad.

El estándar de color a\* disminuyó en todas las muestras, esto quiere decir que viró hacia tonalidades más verdosas. Finalmente, en cuanto el estándar de color b\*, para el tratamiento térmico a 75°C disminuyó en todos los tipos de leche evaluados. Esto se traduce en que el color evolucionó en dirección al azul. Con el empleo de ultrasonidos, este mismo estándar de color aumentó en leche desnatada y entera, variando hacia tonalidades más amarillentas mientras que en las mezclas disminuyó, evolucionando el color en dirección al azul.

Las diferencias de color para las muestras de leche después de tratamiento térmico y tratamiento térmico asistido mediante ultrasonidos respecto a la leche original se muestran en la tabla 12.

**Tabla 10:** Diferencias de color después de los tratamientos

	TT	TS
Entera	4.42	3.32
Mezcla 2%	5.13	3.18
Mezcla 1%	2.57	1.27
Desnatada	1.99	3.88

Según Tiwari y col. (2008) las diferencias en el color pueden ser clasificadas como muy diferentes si ( $\Delta E > 3$ ), diferente ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) y ligeramente diferentes cuando ( $\Delta E < 1,5$ ). Comparando el color de las muestras tratadas respecto a su color sin tratamiento fueron muy diferentes para la leche entera, para la leche desnatada con el empleo de ultrasonidos y para la mezcla de 2% materia grasa. Fueron diferentes para la leche desnatada y mezcla de 1% materia grasa por tratamiento térmico. En el caso de la mezcla de 1% materia grasa con el empleo de ultrasonidos fue ligeramente diferente. Se observa una mayor diferencia de color en las muestras que se sometieron a tratamiento térmico, excepto para la leche desnatada.

#### **4. Conclusiones.**

El empleo de ultrasonidos reduce los tiempos de inactivación de *E.coli* CECT 101. El contenido en grasa resultó una barrera para la inactivación de *E.coli* CECT 101, siendo la leche entera aquella que causó mayor protección a la bacteria. Además, se demostró que un aumento de temperatura en los tratamientos por termosonicación provoca un mayor ratio de inactivación.

También se observó que el empleo de calor y calor junto con ultrasonidos provocó ligeras variaciones en las propiedades fisicoquímicas. Mientras que la densidad se mantuvo en el mismo rango de valores para los dos tipos de tratamientos, la bajada del pH y el aumento de la acidez fueron mayores con la utilización de ultrasonidos. Finalmente, pese a que para el ojo humano las diferencias no resultaban evidentes, el color varió con los dos tratamientos, siendo incluso mayor la variación sin el empleo de ultrasonidos. Por tanto, la intensificación ultrasónica del tratamiento térmico de la leche permite reducir los tiempos de tratamiento, sin disminuir la calidad del producto tratado.

## 5. Bibliografía

BELTRÁN, M<sup>o</sup>C & PERIS, C. (2010). *Matèries primers d'origen animal Pràctiques de laboratori*. Editorial Universitat Politècnica de València. Valencia.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. & BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. (2007). *Study of butter fat content in milk of the inactivation of Listeria innocua ATCC 51742 by thermo-sonication*. Editorial Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 176-185.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; SRALEY, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (volumen 2). Apuntes de la asignatura "Microbiología e higiene de los alimentos I". Universitat Politècnica de València. Valencia.

CASTILLO, R.I (2015). *Inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. Valencia.

CHIRALT, A.; MARTÍNEZ, N.; GONZÁLEZ, C.; TALENS, P.; MORAGA, G. (2007). *Propiedades Fisicoquímicas de los alimentos*. Editorial Universitat Politècnica de València. España.

D'AMICO, D.J.; SILK, T.M.; WU, J.; GUO, M. (2006). *Inactivation of microorganisms in milk and Apple cider treated with ultrasound*. Journal of Food Science, 69, 556-563

EARNSHAW, R.G.; APLEYARD, J. & HURST, R.M. (1995). *Understanding physical inactivation processes: Combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure*. Editorial International Journal of Food Microbiology, 28, 197-219.

EL PAÍS, 2018. *El fin de cuotas no salva la leche*, visitado el 28/06/2018, [https://elpais.com/economia/2018/04/12/actualidad/1523525983\\_689235.html](https://elpais.com/economia/2018/04/12/actualidad/1523525983_689235.html)).

FAIRCHILD, T. M.; SWARTZEL, K. R & FOEGEDING, P. M. (1994). *Inactivation kinetics of innocua in skim milk in a continuous flow processing system*. Editorial Journal of Food Science.

GAZE, J. (2005). *Microbiological aspects of thermally processed foods*. Editorial Journal of Applied Microbiology, 98, 1381-1386.

HOLDSWORTH, S.D. LONDON etc. (1997). *Thermal processing of packaged foods*: Blackie Academic & Professional. Apuntes de la asignatura "Procesado de alimentos II". Universitat Politècnica de València. Valencia.

HONG, S.I & PYUN, Y.R. (1999). *Inactivation kinetics of Lactobacillus plantarum by high pressure carbon dioxide*. Editorial Journal of Food Science, 64, 728-733.

KODA, S.; MIYAMOTO, M.; TOMA, M.; MATSUOKA, T.; MAEBAYASHI, M. (2009). *Inactivation of Escherichia coli and Streptococcus mutans by ultrasound at 500 kHz*. Editorial Ultrasonics - Sonochemistry, 16, 655-659.

(KONICA MINOLTA SENSING AMERICAS, 2014)  
<http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/06/componente-especular-incluido-vs-componente-especular-excluido/>. Consultado en fecha 24/05/2018.

LEE, H.; ZHOU, B.; LIANG, W.; FENG, H.; SCOTT, E. (2009). *Inactivation of Escherichia coli cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling*. Editorial J. Food Eng, 93, 354-364.

LIN, H.M.; YANG, Z.Y & CHEN, L-F. (1993). *Inactivation of Leuconostoc dextranicum with carbon dioxide under pressure*. Editorial Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal, 52, B29-B34.

LINTON, R.H.; CARTER, W.H; PIERSON, M.D.; HACKNEY, C.R & EIFERT, J.D. (1996). *Use of a modified Gompertz equation to predict effects of temperature, pH and NaCl on the inactivation of Listeria monocytogenes Scott A heated in infant formula*. Editorial Journal of Food Protection, 59, 16-23.

MOTT, ROBERT L. (2006). México etc: Pearson education.

MULET, A.; BENEDITO, J.; BON, J. & SANJUÁN, N. (1999). *Low intensity ultrasonic in food technology*. Editorial Food Science and Technology International, 5(4): 285-297.

ORTUÑO, C. (2014). *Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos*. Tesis doctoral en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universitat Politècnica de València. 355pp.

ORTUÑO, C.; QUILES, A & BENEDITO, J. (2014). *Inactivation kinetics and cell morphology of E.coli and S.cerevisiae treated with ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub>*. Editorial Food Research International, 62: 955-964.

PELEG, M. (2006). *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems*. Florida, EE.UU: CRC Boca Ratón.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R.C. (2003). *Inactivation of microbes using ultrasound*. Editorial J. Food Microbiology, 87, 207-2016.

ROMERO, R.; ZÚNICA, L. (2013). *Métodos estadísticos para Ingenieros*. Editorial Universitat Politècnica de València. Valencia.

SUPENO, P.K. (2000). *Sonochemical formation of nitrate and nitrite in water*. Editorial Ultrasonics Sonochemistry. 7., 109-113.

SORIA, A.C. & VILLAMIEL, M. (2010). *Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food*. Editorial Trends in Food Science and Technology. 21(7), 323-331.

TETRA PACK, *Tecnología UHT para alimentos y productos lácteos*, consultado el 28/06/2018, <https://www.tetrapak.com/es/processing/uht-treatment.>)

TIWARI, B.K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C.P. & CULLEN, P.J. (2008). *Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response Surface methodology*. Editorial LWT-Food Science and Technology, 41, 1876-1883.

UGARTE-ROMERO, E.; FENG, H.; MARTIN, S.E.; CADWALLADER, K.R. & ROBINSON, S.J. (2006). *Inactivation of Escherichia coli with power ultrasound in Apple cider*. Editorial Journal of Food Science, 71, 102-108.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M. & GEURTS, T.J. (2006). *Dairy Science and Technology* (2nd Ed.). Editorial Boca Ratón.

ZAPICO, P.; DE PAZ, M.; MEDINA, M. & NUÑEZ, M. (1999). *The effects of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against Listeria innocua*. Editorial International Journal of Food Microbiology, 46, 151-157.

ZHU, J.; WANG, Y.; LI, X.; LI, B.; LIU, S.; CHANG, N.; JIE, D.; NING, C.; GAO, H.; MENG, X. (2017). *Combined effects of ultrasound, heat and pressure on Escherichia coli O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry juice*. Editorial Ultrasonics Sonochemistry, 37, 251-259.