

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

MÉTODOS NO TÉRMICOS PARA LA PASTEURIZACIÓN DE LECHE DE CABRA Y MATERNA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

Grado en Biotecnología

Trabajo de Fin de Grado

ALUMNA: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

TUTORES ACADÉMICOS: Jose J. Benedito Fort
Jose Vicente García-Pérez

TUTORA EXPERIMENTAL: Ingrid Paniagua Martínez

Curso académico: 2019/2020
Valencia, julio de 2020



TÍTULO: Métodos no térmicos para la pasteurización de leche de cabra y materna.

RESUMEN

La demanda de los consumidores evoluciona constantemente, por lo que actualmente está aumentando la búsqueda de procedimientos de conservación de alimentos que ofrezcan productos, como es el caso de la leche comercial, con el mínimo impacto sobre sus propiedades organolépticas y nutricionales, sin renunciar al aumento de vida útil y seguridad que las tecnologías convencionales garantizan. Por lo que se refiere a la leche materna es almacenada en bancos de leche y sometida a pasteurización (método Holder) antes de ser suministrada al neonato. En este caso, es interesante el uso de nuevos métodos que conserven tanto los nutrientes (lactosa, aminoácidos...) como los componentes del sistema inmunitario (citoquinas, inmunoglobulinas...) que contiene, manteniendo además su seguridad. Las opciones que más se están estudiando actualmente son métodos no térmicos, ya que los tratamientos térmicos intensos se relacionan con una disminución importante de la calidad de los alimentos tratados. Algunas de las más interesantes son las basadas en Ultrasonidos de Potencia (HPU), Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEF) y Fluidos Supercríticos (SF). El objetivo de este trabajo ha sido analizar la efectividad del uso de HPU, PEF y CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos de potencia (SC-CO₂ + HPU), como tratamientos de inactivación de la microbiota de leche de cabra y materna.

En cuanto al tratamiento con HPU, no se ha observado una efectividad significativa (reducciones menores a 0.7 ciclos-log), mientras que en el caso de PEF se han conseguido inactivaciones de entre 1.4 y 5.1 ciclos-log de mesófilos aerobios y una inactivación notable (casi total) de enterobacterias. Sin embargo, es necesaria más investigación sobre estos dos métodos. Por otra parte, la combinación de SC-CO₂ + HPU ha demostrado poseer un efecto sinérgico y se han logrado inactivaciones totales tanto de mesófilos aerobios como de enterobacterias en tan sólo dos minutos.

Así pues, los tratamientos no térmicos y la combinación de estos, principalmente SC-CO₂ + HPU, pueden ofrecer alimentos tanto para la población en general, como para neonatos, seguros y con mejores propiedades nutricionales y sensoriales que los obtenidos tras el procesamiento térmico convencional. Sin embargo, es necesaria más investigación al respecto, ya que es fundamental su optimización y puesta a punto para asegurar alimentos con características y estabilidad óptimas.

Palabras clave: Pulsos eléctricos de alta intensidad, ultrasonidos de potencia, fluidos supercríticos, pasteurización, leche.

Alumna: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

Tutor académico: Jose J. Benedito Fort

Jose Vicente García-Pérez

Tutora experimental: Ingrid Paniagua Martínez

Curso académico: 2019/2020

Valencia, julio de 2020

TITLE: Nonthermal methods for pasteurization of goat and human milk.

ABSTRACT

Consumer demand is constantly evolving, so nowadays is increasing the research about food preservation procedures that offer products, in the case of commercial milk, with the minimum impact on its organoleptic and nutritional properties, without quitting the increased shelf life and safety that conventional technologies guarantee. With regard to human milk, it is stored in milk banks and subjected to pasteurization (Holder method) before being provided to the newborn. In this case, it is interesting the use of new methods that preserve the nutrients (lactose, amino acids ...) and the components of the immune system (cytokines, immunoglobulins...) that it contains, while also assuring its safety. The options that are currently being studied the most are nonthermal methods, since intense thermal treatments are related to a significant decrease in the quality of the treated food. Some of the most interesting are those based on High Power Ultrasound (HPU), High Intensity Electric Pulses (PEF) and Supercritical Fluids (SF). The objective of this research work was analyzing the effectiveness of the use of HPU, PEF and supercritical CO₂ assisted by power ultrasound (SC-CO₂ + HPU), as inactivation treatments for goat and human milk microbiota.

Regarding HPU treatment, no significant effectiveness has been observed (reductions of less than 0.7 log-cycles), whereas in the case of PEF, inactivations between 1.4 and 5.1 log-cycles of aerobic mesophiles and a notable inactivation (almost total) of enterobacteria have been achieved. However, more research is needed on these two methods. On the other hand, the combination of SC-CO₂ + HPU has had a synergistic effect and total inactivations of both aerobic mesophiles and enterobacteria have been achieved in just two minutes.

Therefore, nonthermal treatments and the combination of them, mainly SC-CO₂ + HPU, can offer food for both the general population and neonates, safe and with better nutritional and sensory properties than those obtained after conventional thermal processing. However, more research is necessary in this regard, since its optimization and fine-tuning are essential to ensure foods with optimal characteristics and stability.

Key words: Pulsed electric fields, high power ultrasounds, supercritical fluids, pasteurization, milk.

Student: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

Academic tutor: Jose J. Benedito Fort

Jose Vicente García-Pérez

Experimental tutor: Ingrid Paniagua Martínez

Academic year: 2019/2020

Valencia, July 2020

TÍTOL: Mètodes no tèrmics per a la pasteurització de llet de cabra i materna.

RESUM

La demanda dels consumidors evoluciona constantment, per la qual cosa, actualment està augmentant la recerca de procediments de conservació d'aliments que oferisquen productes, com és el cas de la llet comercial, amb el mínim impacte sobre les seues propietats organolèptiques i nutricionals, sense renunciar a l'augment de vida útil i seguretat que les tecnologies convencionals garantixen. Pel que es referix a la llet materna, és emmagatzemada en bancs de llet i sotmesa a pasteurització (mètode Holder) abans de ser subministrada al nounat. En aquest cas, és interessant l'ús de nous mètodes que conserven tant els nutrients (lactosa, aminoàcids...) com els components del sistema immunitari (citoquines, immunoglobulines...) que conté, mantenint a més la seua seguretat. Les opcions que més s'estan estudiant actualment són mètodes no tèrmics, ja que els tractaments tèrmics intensos es relacionen amb una disminució important de la qualitat dels aliments tractats. Algunes de les més interessants són les basades en Ultrasons de Potència (HPU) , Polsos Elèctrics d'Alta Intensitat (PEF) i Fluids Supercrítics (SF).

L'objectiu d'aquest treball ha sigut analitzar l'efectivitat de l'ús de HPU, PEF i CO₂ supercrític assistit per ultrasons de potència (SC-CO₂ + HPU), com a tractaments d'inactivació de la microbiota de llet de cabra i materna.

Quant al tractament amb HPU, no s'ha observat una efectivitat significativa (reduccions menors a 0.7 cicles-log), mentres que en el cas de PEF s'han aconseguit inactivacions d'entre 1.4 i 5.1 cicles-log de mesòfils aerobis i inactivació notable (quasi total) d'enterobacteris. No obstant això, és necessària més investigació sobre estos dos mètodes. D'altra banda, la combinació de SC-CO₂ + HPU ha demostrat posseir un efecte sinèrgic i s'han aconseguit inactivacions totals tant de mesòfils aerobis com d'enterobacteris en tan sols dos minuts.

Així, doncs, els tractaments no tèrmics i la combinació d'estos, principalment SC-CO₂ + HPU, poden oferir aliments, tant per a la població en general, com per a nounats, segurs i amb millors propietats nutricionals i sensorials que els obtinguts després del processament tèrmic convencional. No obstant això, és necessària més investigació al respecte, ja que és fonamental la seua optimització y posada al punt per a assegurar aliments amb característiques i estabilitat òptimes.

Paraules clau: Polsos elèctrics d'alta intensitat, ultrasons de potència, fluids supercrítics, pasteurització, llet.

Alumna: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

Tutor acadèmic: Jose J. Benedito Fort

Jose Vicente García-Pérez

Tutora experimental: Ingrid Paniagua Martínez

Curs acadèmic: 2019/2020

València, juliol de 2020

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA LECHE MATERNA	2
1.2	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA LECHE COMERCIAL	3
1.3	OBJETIVOS	4
2	MÉTODOS TÉRMICOS DE PASTEURIZACIÓN DE LECHE	4
3	MÉTODOS NO TÉRMICOS DE PASTEURIZACIÓN DE LECHE	5
3.1	PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD (PEF)	6
3.2	ULTRASONIDOS DE POTENCIA (HPU).....	8
3.3	CO ₂ SUPERCRÍTICO ASISTIDO POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA (SC-CO ₂ + HPU)	9
3.4	COMBINACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS NO TÉRMICOS	10
4	PASTEURIZACIÓN EN LECHE MEDIANTE PEF, HPU Y SC-CO₂ + HPU	10
4.1	MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1.1	Muestras	10
4.1.2	PEF	11
4.1.3	HPU	12
4.1.4	SC-CO ₂ + HPU	13
4.1.5	Esterilización de los equipos	15
4.1.6	Inactivación microbiana en muestras de leche materna y de cabra	15
4.1.6.1	PEF	15
4.1.6.2	HPU	15
4.1.6.3	SC-CO ₂ + HPU	15
4.1.7	Determinación de microorganismos mesófilos totales y enterobacterias	16
4.1.8	Análisis estadístico	17
4.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.2.1	PEF	17
4.2.2	HPU	23
4.2.3	SC-CO ₂ + HPU	24
5	CONCLUSIONES	30
6	BIBLIOGRAFÍA	31

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad.

Figura 2. Esquema del equipo de ultrasonidos de alta potencia.

Figura 3. Esquema del equipo de CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos de alta potencia (SC-CO₂ + HPU). Figura extraída de Gomez-Gomez et al., 2020.

Figura 4. Relación entre el caudal obtenido para la leche de cabra y materna a 30°C en el equipo de PEF y la velocidad de la bomba.

Figura 5. Relación entre la temperatura final (°C) y las distintas condiciones de intensidad de campo (kV/cm) y densidad de energía (kJ/L). Las condiciones utilizadas en los experimentos de inactivación se encuentran marcadas con un asterisco (*).

Figura 6. Relación entre la temperatura final (°C) y la densidad de energía (kJ/L) en leche de cabra y leche materna.

Figura 7. Relación entre el caudal obtenido para la leche de cabra y materna a 30°C en el equipo de HPU y la velocidad de la bomba.

Figura 8. Inactivación de mesófilos aerobios con tratamientos de SC-CO₂ + HPU a tres condiciones de presión y temperatura diferentes

Figura 9. Inactivación de enterobacterias con tratamientos de SC-CO₂ + HPU a tres condiciones de presión y temperatura diferentes

Figura 10. Medias e intervalos LSD de la inactivación de mesófilos aerobios en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes temperaturas.

Figura 11. Medias e intervalos LSD de la inactivación de mesófilos aerobios en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes presiones.

Figura 12. Medias e intervalos LSD de la inactivación de mesófilos aerobios en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes tiempos de tratamiento.

Figura 13. Medias e intervalos LSD de la inactivación de enterobacterias en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes presiones.

Figura 14. Medias e intervalos LSD de la inactivación de enterobacterias en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes temperaturas.

Figura 15. Medias e intervalos LSD de la inactivación de enterobacterias en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes tiempos de tratamiento.

Índice de tablas

Tabla 1. Diluciones seriadas cultivadas para los diferentes tratamientos y las diferentes determinaciones microbiológicas en leche de cabra y materna.

Tabla 2. Inactivación de la microbiota de leche de cabra mediante tratamientos de PEF.

Tabla 3. Inactivación de la microbiota de leche materna mediante tratamientos de PEF.

1. Introducción.

Cada vez más, los consumidores demandan nuevos métodos de procesamiento de alimentos que supongan un menor impacto en su calidad organoléptica y en su contenido nutricional. Es por esto que, el estudio de nuevos métodos de esterilización está ganando peso y cada vez más grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en su puesta a punto y optimización para el tratamiento de diferentes alimentos tanto sólidos como líquidos (Huang y Wang, 2009; Qin et al., 1996).

Concretamente, la aplicación de estos métodos es de gran importancia en la leche, tanto materna como comercial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) recomiendan la lactancia materna hasta los dos años o más, por lo tanto, en los casos en los que no es posible disponer de leche de la propia madre, la opción más recomendable es recurrir a la leche de bancos de leche materna. Es decir, donada de otras madres y almacenadas en hospitales. Esta necesidad se ve acentuada en el caso de bebés prematuros. La leche materna es un sistema biológico complejo que contiene nutrientes, elementos bioactivos, componentes del sistema inmunitario, lípidos, enzimas y bacterias beneficiosas (Arslanoglu et al., 2010; Koletzko et al., 2011). Todos estos compuestos ayudan a que el recién nacido crezca sano. Se ha demostrado que la leche materna disminuye la incidencia de asma, dermatitis atópica, celiaquía, enfermedad inflamatoria intestinal y muerte súbita del lactante, reduce el riesgo cardiovascular y permite un mejor desarrollo neurológico, además de proteger a los nacidos prematuros o de muy bajo peso ante la retinopatía de la prematuridad, la sepsis y la enterocolitis necrosante, reduciendo así el riesgo de morbilidad (García Lara et al., 2015). Por todo esto, es fundamental alimentar a los recién nacidos con leche materna y conservarla de forma que se mantengan intactas sus propiedades, asegurando la calidad microbiológica necesaria.

En los bancos de leche materna se pasteurizan las muestras tras la recogida debido a que pueden contener patógenos. Actualmente, el tratamiento que se recomienda para pasteurizar la leche donada es un tratamiento térmico, concretamente una pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos, llamada pasteurización Holder (Peila et al., 2017). Se recomienda esta técnica de pasteurización porque, aunque el producto resultante pierde una parte importante de sus compuestos beneficiosos y protectores para los lactantes, presenta una calidad y funcionalidad muy superior a la de la leche de fórmula.

El consumo de leche no es sólo importante en los primeros años de vida y durante el desarrollo, sino que juega un papel importante a lo largo de toda la vida adulta. La leche comercial aporta muchos nutrientes, además de agua y minerales, como el fósforo y el potasio. Es rica en proteínas, como la caseína, seroglobulinas, albúminas y lactoferrina, y en azúcares, como la lactosa. Además, también contiene vitaminas, enzimas digestivas, lípidos y una gran cantidad de calcio. Los productos lácteos son una parte importante de la dieta humana, ya que proporcionan muchos nutrientes que son difíciles de obtener en dietas con bajo contenido o ausencia de lácteos. Contribuyen al 52-65% de la ingesta diaria recomendada de calcio y al 20-28% de la ingesta diaria recomendada de proteína, dependiendo de la edad del consumidor (Rozenberg et al., 2016). Debido a su alto contenido en calcio, favorece la formación de hueso y ayuda a

prevenir enfermedades como la osteoporosis. Además, se sugiere que las proteínas de la leche pueden modular la regulación del peso corporal mediante mecanismos independientes del calcio y que los lácteos pueden actuar como protectores ante patologías comunes como las cardiovasculares o el cáncer, además de reducir el riesgo de hipertensión (Abete et al., 2011; Fernández et al., 2015; Miller et al., 2000; Rozenberg et al., 2016).

De igual modo que con la leche materna, antes de la distribución de la leche comercial es necesario llevar a cabo un tratamiento de conservación. Este recibe diferentes nombres dependiendo de la temperatura a la que se lleve a cabo y el tiempo de duración, pero todos ellos son térmicos. Debido a las altas temperaturas empleadas, la leche se ve afectada negativamente en sus propiedades organolépticas y nutricionales, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias menos dañinas para el producto final.

Numerosos artículos científicos han estudiado los efectos negativos del tratamiento térmico sobre la leche materna y comercial, a continuación se describirán brevemente los más relevantes.

1.1. Efectos del tratamiento térmico en la leche materna.

En primer lugar, los componentes del sistema inmune son parte esencial de la nutrición del recién nacido, ya que son transferidos a partir de la leche y les dota de inmunidad pasiva, permitiéndoles neutralizar los agentes infecciosos en los primeros meses de vida (Rossato, 2008). Se ha comprobado que, tras la pasteurización, se produce una disminución significativa de citoquinas (Delgado et al., 2014), lactoferrina, eritropoyetina e inmunoglobulinas A (IgA), G (IgG) y M (IgM). También se ha visto una reducción de algunos factores de crecimiento, como IGF-1 e IGF-2. Por último, se ven también afectadas las células inmunitarias (células T, células B, macrófagos y neutrófilos), ya que se inactivan por completo todos los componentes celulares de la leche (Ewaschuk et al., 2011; Koenig et al., 2005).

Por otra parte, la lisozima se encuentra en grandes concentraciones en el calostro y es un factor clave en la defensa de las membranas mucosas contra las infecciones (Coutinho et al., 1998). Se ha reportado que tras la pasteurización de la leche materna la concentración de esta enzima disminuye entre un 65% y un 85% (Koenig et al., 2005).

Los antioxidantes presentes en la leche materna también juegan un papel importante en la nutrición del recién nacido, ya que el estrés oxidativo puede provocar patologías, principalmente en los pulmones, debido a que el sistema respiratorio aún está madurando en la etapa posnatal (Gómez et al., 2007). Se ha visto que la pasteurización de la leche reduce su capacidad antioxidante, principalmente provocando la disminución de la actividad enzimática de GPx y la actividad superóxido dismutasa (Silvestre, 2008), así como del contenido en ácido ascórbico y vitamina E (Delgado et al., 2013).

En cuanto a los macronutrientes, no se han visto grandes reducciones tras el tratamiento térmico. El contenido en oligosacáridos (Bertino et al., 2008), grasa, minerales, vitaminas, zinc y hierro parecen no verse alterados. Algunas excepciones

serían el contenido en proteína total (Koenig et al., 2005), el aminoácido esencial lisina y la vitamina B12, que se reduce en un 48% tras la pasteurización Holder (Ewaschuk et al., 2011; Peila et al., 2016). Es importante destacar también el papel del calcio en la dieta de los infantes y las posibles consecuencias que puede tener la pasteurización de la leche sobre él. Se ha visto que el daño térmico tiene un efecto negativo sobre la retención del calcio y posterior distribución en los tejidos durante el desarrollo. Esto se ha reportado en tratamientos en los que se utilizan temperaturas superiores a las utilizadas en la pasteurización Holder, pero debido a su gran importancia en la lactancia, es un factor que se debe tener en cuenta a la hora de evaluar las diferentes posibilidades de esterilización de leche materna (Delgado-Andrade et al., 2006; Seiquer et al., 2010).

Asimismo, se ha estudiado el efecto producido en hormonas, encontrando reducciones de la adiponectina e insulina en la leche en un 32,8% y un 46,1%, respectivamente (Ley et al., 2011). Estas hormonas están relacionadas con un menor riesgo de enfermedad metabólica a largo plazo en el infante, por lo que su reducción durante la lactancia debido a la pasteurización puede tener un impacto crítico en el metabolismo.

También se ha visto que el tratamiento térmico afecta a la reología y a la estructura de la emulsión de la leche (Raikos, 2010), además de reducir significativamente los hidrocarburos aromáticos en un 70% (Contador et al., 2015). Esto sugiere que la pasteurización también puede afectar a las propiedades organolépticas de la leche.

1.2. Efectos del tratamiento térmico en la leche comercial.

Actualmente, existe una gran variedad de leches comerciales disponibles que pueden provenir de diferentes especies animales. Se han llevado a cabo investigaciones sobre los efectos producidos por los tratamientos térmicos, observándose que estos dependen de la intensidad y duración del tratamiento, así como del tipo de leche (Clement, 2018). A pesar de la variabilidad producida por estos factores, se ha observado que, aunque algunas proteínas son más resistentes al tratamiento térmico que otras, todas ellas son sensibles al calor y se ven afectadas ante las altas temperaturas empleadas (Elagamy, 2000). En cuanto a la leche de cabra en concreto, no se han realizado muchos estudios, pero sí sobre leche procedente de otros animales, cuyos resultados pueden ser extrapolados para comprender los efectos de la pasteurización sobre ésta.

El calor produce efectos sobre componentes necesarios para mantener la calidad y las propiedades de la leche. Entre ellos se encuentran la degradación de la lactosa a ácidos orgánicos, la formación de lactulosa (isómero de la lactosa que se forma durante el calentamiento intenso de la leche), la desnaturalización de las proteínas del suero, la destrucción de vitaminas y enzimas, la hidrólisis de proteínas y lípidos, la polimerización de proteínas y la alteración del equilibrio calcio/fósforo. Por otro lado, también se producen efectos relacionados con las propiedades organolépticas, como pardeamiento y sabores desagradables (Calvo y de la Hoz, 1992), y la pérdida de valor nutricional, ya que se modifica la biodisponibilidad de los nutrientes, se produce inactivación enzimática y se agotan los antioxidantes naturales. Esto es debido principalmente a la reacción de Maillard, que continúa produciendo sustancias no deseadas durante el almacenamiento de las leches tratadas térmicamente (Calligaris et al., 2004; Elliott et al., 2005; Patton, 1958; Sakkas et al., 2014; Van Boekel, 1998; Villamiel et al., 1997).

Se ha visto que tratamientos térmicos en leche de vaca desnatada destruyen toda la vitamina B12, aproximadamente el 60% de la tiamina y la vitamina B6, el 70% del ácido ascórbico y el 30% del ácido fólico. La lisina también se ve afectada, reduciéndose en un 21%. Además, se forma lactulosa y la mayoría de las proteínas del suero se desnaturalizan (Kilshaw et al., 1982).

Concretamente en leche de cabra, se ha visto que la actividad de la fosfatasa alcalina se ve reducida durante la pasteurización a 72°C durante 15 segundos (Felipe et al., 1997). También se produce la desnaturalización de las proteínas del suero, pudiendo así demostrar la sensibilidad al calor de las principales proteínas que componen el suero de la leche de cabra. Asimismo, se vio una disminución de la cantidad de proteínas del suero que permanecen en disolución a pH 4.6 (Felipe et al., 1997).

Además, los tratamientos térmicos provocan diferentes grados de desnaturalización, agregación e interacción entre las proteínas. Estos cambios de composición y conformación en las proteínas de la leche afectan las propiedades funcionales de los lácteos, como la solubilidad, gelatinización, estabilidad al calor y emulsificación, las cuales son muy importantes para la industria de los lácteos (Clement, 2018).

1.3. Objetivos.

Por todo lo expuesto anteriormente, es fundamental el desarrollo, la puesta a punto y la optimización de tratamientos no térmicos para la pasteurización de la leche materna y comercial que no afecten a su composición nutricional, concentración de componentes bioactivos, conformación ni propiedades organolépticas. Por ello, el principal objetivo de este trabajo es analizar de forma preliminar la viabilidad de diferentes tipos de tratamientos no térmicos como una alternativa a los procesos de pasteurización tradicionales basados en calor. Para alcanzar este objetivo se han planteado dos objetivos principales:

- 1) Describir las características de los principales tipos de tratamientos no térmicos y sus aplicaciones en la pasteurización de leche.
- 2) Determinar la viabilidad de los ultrasonidos de potencia, pulsos eléctricos de alta intensidad y CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos de potencia, para la pasteurización no térmica de leche de cabra y materna.

2. Métodos térmicos de pasteurización de leche.

La pasteurización fue descubierta por Luis Pasteur en el año 1864. Consiste en calentar el producto, en este caso leche, en equipos diseñados específicamente para ello a una temperatura determinada, que se mantiene durante todo el procedimiento a esa temperatura o a una superior. A diferencia de la esterilización, que busca inactivar todos los microorganismos presentes en la leche, el objetivo de la pasteurización es reducir la cantidad de patógenos viables para disminuir la probabilidad de que causen enfermedades y, además, prevenir la acidificación de la leche (Watts, 2016).

Por un lado, la esterilización se clasifica según dos métodos principales: el método convencional, también llamado *in-bottle sterilization*, y el método aséptico o UHT, ambos caracterizados por utilizar temperaturas por encima de los 100°C. En el primero, la leche se envasa antes del tratamiento y después se eleva a una temperatura de entre 105 y 110°C durante un intervalo de tiempo de entre 30 y 45 minutos. En el segundo, la leche se calienta a una temperatura de entre 135 y 150°C durante un tiempo de 1 a 20 segundos, tras lo que es envasada (ODISHA UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY, 2020). Por otro lado, la pasteurización se puede llevar a cabo como un proceso continuo o discontinuo y dependiendo de la temperatura alcanzada y el tiempo de procesamiento se pueden diferenciar tres tipos. De mayor tiempo de duración a menor, se encuentra en primer lugar la pasteurización *vat*, con una duración de 30 minutos y temperatura de 63°C. A continuación, la pasteurización a alta temperatura y corto tiempo (*high temperature short time pasteurization*, HTST), que dura 15 segundos y eleva la temperatura a los 72°C. Por último, la pasteurización *higher-heat shorter time* (HHST), que engloba duraciones de entre 0.01 y 1 segundos y temperaturas que van de los 89°C a los 96°C (Watts, 2016). El proceso que más se emplea industrialmente es el HTST, ya que permite trabajar con grandes volúmenes y necesita poco tiempo y un equipamiento sencillo (González Márquez, 2007; INTEREMPRESAS, 2018).

Según algunos estudios, los tratamientos mencionados anteriormente destruyen de igual manera a los patógenos presentes en la leche (Ball, 1943). Sin embargo, otros estudios sugieren que esto no es cierto, como en el caso de las bacterias termodúricas, que no se inactivan en la misma medida durante los diferentes tipos de pasteurización. Estas bacterias en concreto tienen importancia en la industria láctea porque afectan negativamente la calidad de los productos derivados obtenidos de la leche, concretamente el queso (Reginensi et al., 2015).

La pasteurización ha sido uno de los grandes progresos de la seguridad alimentaria, ya que, hasta su descubrimiento, muchos alimentos no podían conservarse de manera fiable y se producían enfermedades causadas por consumir alimentos en mal estado. Hoy en día se sabe que el consumo de leche cruda es causante de diversas enfermedades (Bryan, 1983; Jay-Russell, 2010; Lucey, 2015), como enteritis (Wood et al., 1992), listeriosis (Latorre et al., 2011) o tuberculosis (Doran et al., 2009; Giuseppina et al., 2006). Por todo esto, es un proceso crucial que actualmente se ha generalizado para tratar muchos de los alimentos que consumimos, ya que es un método sencillo que, además de garantizar la inocuidad, permite un almacenamiento a largo plazo y transporte a largas distancias, por lo que resulta también muy atractivo económicamente. A pesar de esto, al tratarse de un tratamiento térmico es perjudicial para las propiedades y composición de la leche y por tanto es necesario desarrollar nuevos métodos no térmicos, algunos de los cuales se describirán a continuación.

3. Métodos no térmicos de pasteurización de leche.

Las técnicas de procesamiento alternativas que más se están investigando actualmente son el procesamiento a alta presión (HPP), la irradiación ultravioleta (UV-C), el procesamiento termo-ultrasónico (HPU), los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF) y el procesamiento con CO₂ supercrítico (SC-CO₂). De los dos primeros se hablará

brevemente a continuación, mientras que los tres últimos se describirán en los siguientes apartados más detalladamente, ya que son los que se han abordado en el presente trabajo.

El procesamiento a alta presión consiste en aplicar presiones de entre 400 y 800 MPa durante tiempos de hasta 10 minutos. Esta técnica provoca en los microorganismos la inhibición de las enzimas y proteínas, además de alteraciones en las membranas celulares y mecanismos genéticos (Peila et al., 2017). En el caso de la leche comercial, se han estudiado diferentes condiciones de procesamiento y diferentes tipos de leche y se ha concluido que el efecto de inactivación depende tanto de las condiciones de HHP como de la composición de la leche (Gervilla et al., 2000), por lo que sería necesaria una investigación en profundidad sobre cada tipo de leche. En cuanto a los efectos producidos (Altuner et al., 2006), se espera que en tratamientos con presión menor a 700 MPa sólo se produzcan cambios en la estructura terciaria de las proteínas, sin llegar a desnaturalizarlas. Por otra parte, en leche materna se ha visto que realizando un tratamiento con presiones inferiores a 400 MPa es posible reducir la carga microbiana reteniendo más componentes inmunológicos, vitaminas y ácidos grasos que con la pasteurización Holder (Peila et al., 2017), obteniendo un producto más parecido a la leche sin tratar que el que se obtiene tras un tratamiento térmico (Viazis et al., 2007). Sin embargo, presenta una serie de limitaciones como el alto coste de los equipos (Considine et al., 2007) y la dificultad de llegar a conclusiones sobre la seguridad y calidad del producto obtenido entre los diferentes grupos de investigación, ya que hay tres parámetros a tener en cuenta (presión, temperatura y tiempo) (Peila et al., 2017). En cuanto a UV-C, se ha visto que es difícil tratar la leche materna, ya que tiene un alto coeficiente de absorción y limita la penetración de los fotones, aunque se han conseguido modificar los equipos para conseguir solucionar este problema. En este sentido, Peila et al. (2007) observaron que tras el tratamiento se conservaban los factores inmunológicos, enzimas y ácidos grasos en mayor medida que con la pasteurización Holder, consiguiendo además una mayor capacidad de inactivación bacteriana. Sin embargo, es necesario profundizar en la investigación de esta técnica ya que aún no se dispone de información concluyente (Peila et al., 2007). Por último, respecto al tratamiento de leche comercial con UV-C, se ha visto que es posible inactivar más de 5 ciclos-log de *L. monocytogenes* inoculada en leche de cabra (Matak et al., 2005), además de demostrarse una inactivación eficaz de algunos bacteriófagos y otros microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. typhimurium* (Gunter-Ward et al., 2018).

3.1. Pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF).

Antes de que se sugiriera utilizar campos eléctricos de alta intensidad como tratamiento de inactivación microbiana, éstos ya se utilizaban para perforar membranas bacterianas con otro objetivo: la electroporación reversible para introducir o administrar sustancias en el citoplasma celular. En 1960 se demostró que la electroporación irreversible produce la inactivación de microorganismos de manera eficiente, pero no fue hasta finales de la década de 1980 cuando se empezó a estudiar su utilidad en el campo de la conservación de alimentos (Raso et al., 2014). Esta técnica aplicada al sector alimentario consiste en tratar un alimento (líquido o sólido) mediante pulsos cortos (1-10µs) de alto voltaje (Sampedro y Rodrigo, 2015). El alimento es colocado previamente entre dos electrodos separados a una distancia de entre 0.1 y 1 cm en el interior de una

celda de tratamiento aislada. Con el paso del tiempo se ha ido investigando y mejorando la tecnología y los materiales de estos equipos para obtener mejores resultados y actualmente este proceso se puede llevar a cabo tanto de manera continua como discontinua. Los principales parámetros a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo un ensayo de PEF son la intensidad de campo eléctrico (E , kV/cm, Ecuación 1), el tiempo de tratamiento (t , μ s, Ecuación 2) y la densidad de energía (ΔE , kJ/L, Ecuación 3).

$$E = \frac{v}{d} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde v es la diferencia de potencial (kV) y d es la distancia entre los dos electrodos (cm).

$$t = \tau \cdot n \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde τ es la duración del pulso (μ s) y n es el número de pulsos.

$$\Delta E = \frac{v^2 \cdot \tau}{V} \cdot 1000 \cdot n \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde v es el voltaje (V), τ es la duración del pulso (μ s), R es resistencia eléctrica del medio (Ω), V es volumen (L) y n es el número de pulsos.

El tratamiento con PEF provoca en los microorganismos presentes en los alimentos la permeabilización de las membranas y la formación de poros en células y orgánulos (electroporación), produciendo así cambios estructurales y funcionales en la membrana de los mismos (Manas y Pagán, 2005; Raso et al., 2014). Se ha demostrado que la inactivación de las células es un resultado directo del aumento de la permeabilidad de membrana producido por los PEF y no es debida al aumento de temperatura o a los productos de electrólisis formados (Manas y Pagán, 2005). Los efectos provocados en los microorganismos pueden ser reversibles si la intensidad del campo eléctrico es menor a la que puede soportar la célula (campo eléctrico crítico), en cuyo caso provocaría efectos subletales, o irreversibles, en caso de que esta sea superior, provocando su muerte (Manas y Pagán, 2005; Raso et al., 2014). El campo eléctrico crítico depende de la célula (tipo, tamaño, forma...), por lo que la efectividad de los PEF estará subordinada en cierta medida al tipo celular que se va a inactivar. Otros factores de los que dependerá su efectividad son las condiciones del proceso (a mayor campo eléctrico y tiempo de tratamiento, mayor inactivación) y la composición del alimento a tratar. Se ha visto que el campo eléctrico crítico para células vegetales es de entre 1 y 2 kV/cm y para microorganismos es de entre 12 y 20 kV/cm (Soliva-Fortuny et al., 2009), e incluso puede llegar hasta los 30 kV/cm (Heinz et al., 2001). En el caso concreto de la inactivación microbiana en leche se ha visto que valores de intensidad de campo inferiores a 20 kV/cm no presentan efectos significativos, por lo que se deberán utilizar intensidades de campo superiores. Por otro lado, el valor de la densidad de energía también es importante. En leche inoculada con microorganismos patógenos, se han observado inactivaciones de entre 2 y 5 ciclos-log aplicando entre 100 y 550 kJ/L (Sampedro y Rodrigo, 2015).

El procesamiento con PEF ofrece la posibilidad de pasteurizar la leche conservando mejor su frescura y contenido en nutrientes, obteniendo una vida útil similar a la leche pasteurizada mediante métodos térmicos. En cuanto a los efectos producidos en las propiedades fisicoquímicas de la leche, no se han visto efectos significativos sobre

sólidos totales, pH, conductividad eléctrica, viscosidad, densidad, color, tamaño de partícula (Michalac et al., 2003), acidez y contenido de ácidos grasos libres (Odrizola-Serrano et al., 2006). También se ha visto que muchos compuestos bioactivos (vitaminas y antioxidantes) se conservan mejor con PEF que con tratamiento térmico (Raso-Pueyo y Heinz, 2010; Sanchez-Moreno et al., 2009; Soliva-Fortuny et al., 2009). Por otra parte, el tratamiento con PEF afecta a propiedades físicas y reológicas de la leche, como las propiedades de coagulación, en menor medida que el tratamiento térmico, provocando por tanto menos efectos negativos durante la fabricación de productos lácteos como el queso (Floury et al., 2006; Yu et al., 2009).

Además de los buenos resultados obtenidos en cuanto a inactivación microbiológica, la disminución de la temperatura a la que se expone la leche y los menores tiempos de procesado conllevarían una menor pérdida de nutrientes y mayor ahorro de energía (Bermúdez-Aguirre et al., 2011). Por tanto, esta tecnología se presenta como una opción prometedora en un futuro próximo, sin olvidar la necesidad de realizar estudios para poder solucionar algunos de los problemas que todavía presenta, como la dificultad para extrapolar resultados entre los diferentes grupos de investigación (Soliva-Fortuny et al., 2009). Por otra parte, sería interesante el estudio del uso de PEF en el procesamiento de la leche materna, ya que aún no se han realizado investigaciones al respecto.

3.2. Ultrasonidos de potencia (HPU).

Los ultrasonidos de potencia o de baja frecuencia son los que utilizan frecuencias de entre 20 y 100 kHz y potencias de entre 10 y 10000 W/cm² (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011). El objetivo de esta técnica aplicada a la industria alimentaria es provocar la disrupción de las células que se encuentren en el alimento, inactivándolas. Cuando los ultrasonidos atraviesan el alimento desencadenan un fenómeno llamado cavitación (Patist y Bates, 2008; Ulloa et al., 2013), que implica la formación de burbujas de gas en el medio. Estas sufrirán ciclos de compresión y descompresión que dan lugar a su implosión, generando microcorrientes y aumentos de presión y temperatura locales. La intensidad de este fenómeno dependerá de diversos factores, principalmente de la temperatura, presión y composición del medio y de la amplitud de onda de los ultrasonidos. El efecto observado acerca de la inactivación de células microbianas en leche es muy positivo, ya que se han logrado inactivaciones totales o cargas microbianas tras el tratamiento por debajo de los niveles aceptables por las legislaciones de algunos países, incluso con cargas microbianas iniciales cinco veces superiores a las permitidas (Cameron et al., 2009). La inactivación aumenta al combinar los ultrasonidos con calor (termosonicación) o presión (manosonicación), por lo que se podrían conseguir aún mejores resultados (Earrnshaw et al., 1995; Herceg et al., 2012; López-Malo et al., 1999; Ordoñez et al., 1987; Raviyan et al., 2005). Por otro lado, también se ha estudiado la combinación de ultrasonidos y pasteurización convencional mediante HTST, disminuyendo así los tiempos de tratamiento y por tanto las consecuencias negativas derivadas (Bermúdez-Aguirre et al., 2009).

Si se hace una comparación entre la leche tratada mediante sonicación y la leche tratada térmicamente, diferentes grupos de investigación han concluido que la primera presenta ventajas en cuanto a color, homogeneización, apariencia, estabilidad durante el almacenamiento y menores cambios en las propiedades nutricionales (Bermúdez-

Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2008; Bermúdez-Aguirre et al., 2009). También se han reportado resultados positivos en cuanto al aumento de la vida útil de la leche tratada y el aumento de la digestibilidad de la grasa láctea (Delgado, 2012).

En el caso del tratamiento de leche materna, se ha concluido que el producto obtenido tras la aplicación de HPU es mucho más estable que el tratado térmicamente y la emulsión se mantiene durante un tiempo mayor, conservando así mejor los nutrientes presentes en la leche. Además, protege factores inmunológicos como la IgA, IgG y lactoferrina y previene de la pérdida de vitaminas, minerales, proteínas y grasas (Martínez et al., 1992).

Así pues, los HPU tienen un futuro prometedor en la industria alimentaria ya que han proporcionado resultados esperanzadores a la hora de inactivar o acelerar la actividad enzimática, aumentar la vida útil y la calidad de los productos tratados, inactivar microorganismos y facilitar la extracción de componentes bioactivos (Awad et al., 2012). El uso de HPU, si se lleva a cabo a temperaturas adecuadas, previene los efectos negativos asociados a los tratamientos térmicos tradicionales, evitando la desnaturalización de las proteínas (Jambrak et al., 2009).

3.3. CO₂ supercrítico asistido con ultrasonidos de potencia (SC-CO₂ + HPU).

El dióxido de carbono es un gas que se encuentra fácilmente disponible en la naturaleza a una alta pureza. Es económico, seguro a la hora de manejarlo y está aprobado para el procesamiento de alimentos (Brunner, 2005). Por encima de los 31.06°C de temperatura y los 73.83 bar de presión (punto crítico), pasa a estar en estado supercrítico. El CO₂ supercrítico (SC-CO₂) posee una densidad cercana a la de un líquido y una viscosidad y difusividad propia de un gas. Estas propiedades permiten que se pueda mezclar fácilmente con los alimentos y que tenga un gran poder de penetración y extracción como disolvente (Raventós et al., 2002). Cuando el CO₂ se encuentra en estado supercrítico, puede penetrar en las células bacterianas de una manera muy efectiva y alterar las membranas celulares disolviendo los lípidos, afectando negativamente a la actividad enzimática relacionada con la membrana y a los potenciales de membrana, provocando así la muerte de las células (Werner y Hotchkiss, 2006).

Sobre la utilización de CO₂ supercrítico para la pasteurización de leche no se han realizado muchos estudios, pero sí se ha observado que el tratamiento es significativamente más eficiente que el método de pasteurización térmica convencional (HTST), implicando un proceso más suave y efectivo, con el que se puede obtener un producto con una vida útil alta (superior a 35 días) y que mantiene sus propiedades organolépticas (Di Giacomo et al., 2009). También se ha visto que la efectividad de este tratamiento aumenta al aumentar la temperatura y la presión (Spilimbergo et al., 2003; Erkmén, 2012), pero es importante controlar estos parámetros ya que, en el caso de la leche, una elevada presión y temperatura podrían suponer la extracción de compuestos aromáticos y la desnaturalización de proteínas, afectando por tanto negativamente a sus propiedades organolépticas (Di Giacomo et al., 2009).

Además, se ha observado que la combinación con HPU (SC-CO₂ + HPU) mejora en gran medida la efectividad de la inactivación microbiana mediante SC-CO₂, reduciendo los tiempos de tratamiento y aumentando notablemente la reducción final del número de microorganismos (Gomez-Gomez et al., 2020; Ortuño et al., 2012; 2014; Paniagua-Martínez et al., 2016; 2018). Esto se puede explicar debido a que la cavitación producida por los ultrasonidos de potencia daña las células bacterianas acelerando el proceso, además de que genera una agitación intensa que facilita la solubilización del CO₂ y el proceso de transferencia de este al interior de los microorganismos (Benedito et al., 2015). El tratamiento mediante SC-CO₂ provoca un impacto mínimo en las propiedades de los alimentos, y combinado con HPU implica mejores resultados con tiempos de tratamiento mucho menores y condiciones de procesado (presión y temperatura) menos intensas.

3.4. Combinación de diferentes métodos no térmicos.

Actualmente, los tratamientos en los que se combinan diferentes métodos no térmicos son de gran interés, ya que su desarrollo puede ofrecer una serie de ventajas sobre los tratamientos convencionales y los no térmicos de forma individual. A veces, un solo tratamiento no proporciona el resultado deseado para conseguir que el alimento sea seguro o estable. Además, al utilizar más de un tratamiento se puede utilizar cada uno de ellos con condiciones menos agresivas, evitando que se produzcan daños en el alimento o minimizando estos daños y mejorando por tanto su calidad (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). Como ya se ha comentado, se han confirmado efectos sinérgicos en algunas combinaciones de tratamientos, por ejemplo, CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos (SC-CO₂ + HPU). En estos casos, cada uno de los tratamientos por separado no proporciona los resultados deseados, pero al actuar de manera conjunta su efecto en cuanto a inactivación microbiana mejora notablemente, además de permitir reducir los efectos negativos sobre el producto final. Por todo esto, es muy interesante el estudio de los tratamientos de pasteurización no térmicos por separado y en combinación, para así evaluar los efectos de cada uno de ellos y sus combinaciones (efectos sinérgicos) y conseguir un tratamiento que ofrezca resultados óptimos en cuanto a seguridad y calidad.

4. Pasteurización en leche mediante PEF, HPU y SC-CO₂ + HPU.

4.1. Materiales y métodos.

4.1.1. Muestras.

La leche de cabra utilizada en los experimentos fue cedida por la granja experimental del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, situada en la Universitat Politècnica de València. Los diferentes lotes de leche se mezclaron y se guardaron en alícuotas de 100 mL en el congelador a -20°C. Para cada experiencia programada, se sacaban los recipientes necesarios del congelador el día anterior y se dejaban descongelar por completo en la nevera (5-7°C). Antes de las experiencias se utilizó un conductímetro (COND7+ XS, LabProcess, Barcelona, España) para medir su conductividad a 25°C, resultando la misma de 5.22 mS/cm. Las cabras a partir de las cuales se obtuvo la leche

pertenecen a la raza murciano-granadina; en la bibliografía la conductividad de la leche de esta raza de cabra oscila entre 6.5 mS/cm y 4 mS/cm, siendo su media 5.3 mS/cm (Díaz et al., 2014), valor similar al encontrado en el presente trabajo.

Por otra parte, las muestras de leche materna fueron cedidas del banco de leche materna del Hospital La Fe de Valencia. Estas fueron recogidas y envasadas en recipientes estériles de aproximadamente 130 mL, por lo que se guardaron directamente en esos envases en el congelador a -20°C. De igual manera que con la leche de cabra, se sacaban el día anterior a la experiencia para que se descongelaran y se midió la conductividad de cada muestra a 25°C antes de los tratamientos. La media de las conductividades fue de 1.92 mS/cm. En la bibliografía (Kermack y Miller, 1951) se observa que la conductividad de la leche materna oscila entre los valores de 1.50 y 3.20 mS/cm en mujeres sanas y entre 1.50 y 6.75 mS/cm en mujeres con algún desorden en la lactancia.

4.1.2. PEF.

Equipo

El equipo de PEF está formado por un generador de pulsos eléctricos (EPULSUS-PM1-10; Energy Pulse Systems, Lda, Lisboa, Portugal) y una celda de tratamiento contenida dentro de una cabina de protección. La celda de tratamiento tiene una separación entre los electrodos de 3.1 mm y unas dimensiones de electrodo activo de 39 x 3.6 mm.

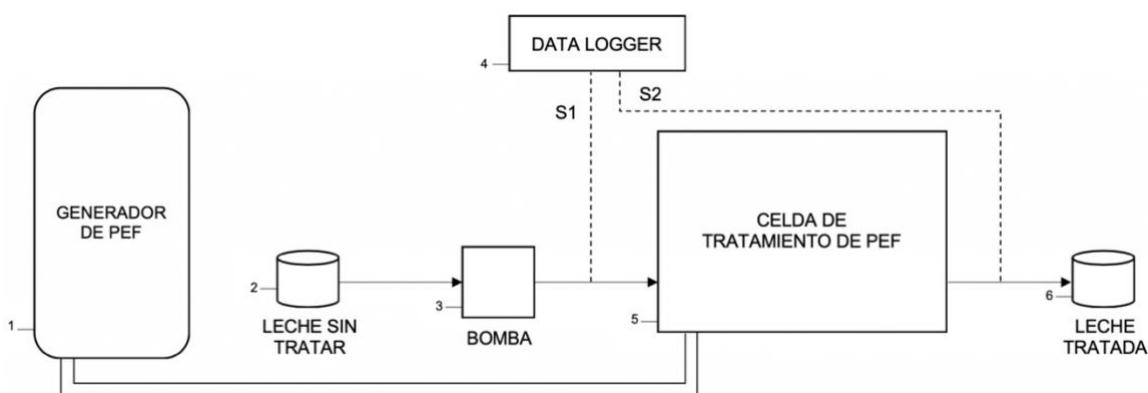


Figura 1. Esquema del equipo de pulsos eléctricos de alta intensidad.

El procedimiento que se sigue para el tratamiento de PEF se observa en la Figura 1, y se describe de la siguiente manera: la leche sin tratar (Figura 1, 2) es conducida a través de un sistema de flujo continuo con la ayuda de una bomba peristáltica (Figura 1, 3; Millipore Corporation, serie K92002058, Darmstadt, Alemania) hasta llegar a la celda de tratamiento de PEF (Figura 1, 5). En la celda, que está conectada a un generador de pulsos eléctricos de alta intensidad (Figura 1, 1), la muestra es tratada. Tras el tratamiento, la muestra es finalmente recogida en un depósito estéril (Figura 1, 6). La temperatura de la muestra es registrada a la entrada (Figura 1, S1) y a la salida (Figura 1, S2) de la celda de tratamiento con un data logger (Figura 1, 4; PCE Ibérica S.L.; Tobarra, España). Los equipos eran esterilizados antes y después de cada tratamiento como se describe en el apartado 4.1.5.

Puesta a punto. Relación entre el caudal y la velocidad de la bomba

En primer lugar, se calcularon de manera experimental los caudales empleados en el equipo de PEF. Para ello, se utilizó leche de cabra a dos temperaturas diferentes, 25°C y 30°C, con el objetivo de observar las diferencias entre ellas. Se midió el caudal para cuatro velocidades de la bomba peristáltica diferentes (posiciones 1, 1.5, 2 y 2.5), haciéndose tres réplicas por cada una de ellas.

Puesta a punto. Estudio de la temperatura final de los tratamientos

Una parte muy importante es controlar la temperatura a la que se eleva la muestra durante los tratamientos, por lo que se llevaron a cabo ensayos a diferentes condiciones de caudales y voltaje de pulso, registrando la temperatura final para poder estudiar esta variable.

Los voltajes que se utilizaron fueron 6.20 y 7.75 kV para leche de cabra y 9.30 y 10.00 kV para leche materna, que se corresponden a una intensidad de campo de 20, 25, 30 y 32.26 kV/cm respectivamente. En lo sucesivo, se utilizará este parámetro dado que es más representativo de la intensidad del tratamiento. La intensidad de campo empleada fue más baja para la leche de cabra porque tiene una conductividad eléctrica muy elevada en comparación con la leche materna (más del doble), por lo que en leche materna se necesitaba más intensidad de campo para obtener una temperatura similar. En cuanto a los caudales utilizados, estos fueron de 45.7 mL/min, 56.7 mL/min y 77.8 mL/min. También se calculó la densidad de energía (kJ/L) para cada una de las condiciones trabajadas y se representó en relación a la intensidad de campo (kV/cm) y la temperatura final (°C).

De esta manera, se pudo ver la relación entre caudal, voltaje y temperatura final y se decidieron las condiciones de los ensayos de inactivación que se realizaron a continuación. En particular, las condiciones seleccionadas fueron tres para la leche de cabra (25 kV/cm y 255.9 kJ/L, 20kV/cm y 163.8 kJ/L y 20kV/cm y 278.9 kJ/L) y tres para la leche materna (32.3 kV/cm y 211.8 kJ/L, 32.3 kV/cm y 263 kJ/L y 30 kV/cm y 227.5 kJ/L).

4.1.3. HPU.

Equipo

Para el tratamiento con ultrasonidos se utilizó un dispositivo ultrasónico digital de la marca Hielscher (modelo UP400St de 400W y 24kHz, Teltow, Alemania).

Este procedimiento se llevó a cabo mediante un sistema de flujo continuo a través de una celda de flujo (Hielscher, modelo FC22K, Teltow, Alemania) de acero inoxidable de un volumen aproximado de 37 cm³ y un sonotrodo (Hielscher, modelo S24d14D, Teltow, Alemania) con sellado en la celda. Además, se acopló una camisa de refrigeración para termostatar el equipo, acoplando un tubo a la entrada y a la salida de la celda de flujo. Para controlar la temperatura se utilizó un baño de agua a 40°C que se circulaba a través de la camisa de refrigeración durante el tratamiento de la muestra. Los equipos eran

esterilizados antes y después de cada tratamiento como se describe en el apartado 4.1.5.

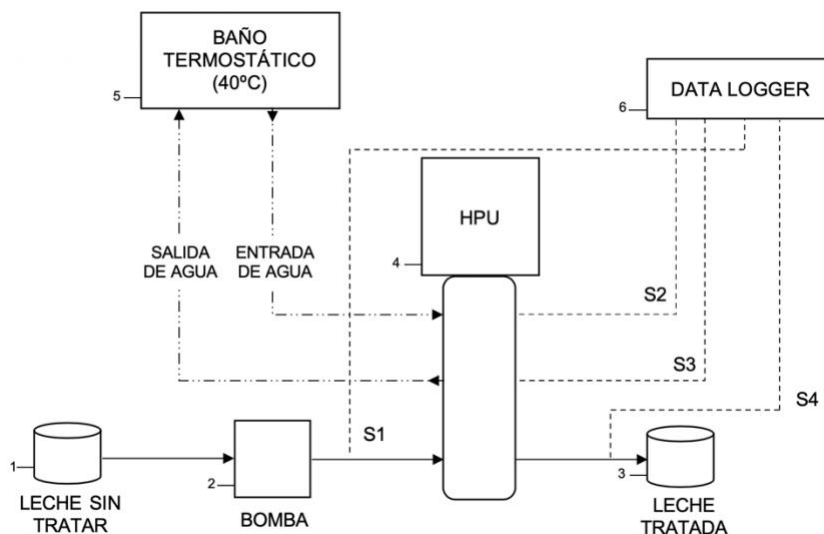


Figura 2. Esquema del equipo de ultrasonidos de alta potencia.

En la Figura 2, se observa como la muestra sin tratar (Figura 2, 1) es impulsada a través una bomba peristáltica (Figura 2, 2; Millipore Corporation, serie K92002058, Darmstadt, Alemania) hasta el equipo de HPU (Figura 2, 4), donde se trata, para después recogerla en un recipiente estéril (Figura 2, 3). En la parte superior se encuentra el baño termostático (Figura 2, 5; Precistern, J.P. Selecta, Abrera, España), con agua a 40°C, que es recirculada desde el baño hasta el equipo de HPU, para enfriarlo, y otra vez al baño. Finalmente, el data logger (Figura 2, 6; PCE Ibérica S.L.; Tobarra, España) consta de cuatro sondas que recogen datos de la temperatura inicial de la muestra (Figura 2, S1), la temperatura del agua que entra desde el baño (Figura 2, S2) y del agua que sale hacia el baño (Figura 2, S3) y, por último, la de la muestra a la salida del equipo de HPU (Figura 2, S4).

Puesta a punto. Cálculo de los caudales

Igual que con el tratamiento de PEF, lo primero que se hizo en los ensayos de HPU fue calcular experimentalmente el caudal en el equipo. Para ello, se utilizó tanto leche de cabra como leche materna a 30°C. En este caso no se varió la temperatura porque ya se había observado que esta no tiene un efecto importante en el caudal, pero sí se utilizaron los dos tipos de muestras para ver si había diferencias. Se midió el caudal para cuatro velocidades diferentes de la bomba peristáltica (posiciones 1, 1.5, 2 y 2.5) y para cada una de ellas se realizaron tres réplicas.

4.1.4. SC-CO₂ + HPU.

Equipo

El equipo de SC-CO₂ + HPU fue diseñado y construido por el grupo ASPA de la Universitat Politècnica de València. El mismo (Figura 3) está compuesto por: tanque de

CO₂ almacenado a temperatura ambiente (Figura 3, 1), depósito de reserva de CO₂ mantenido a -18°C (Figura 3, 2), bomba dosificadora de diafragma (Figura 3, 3; LDB, LEWA, Japón), baño de agua termostático (Figura 3, 4; 1812, Bunsen, Madrid, España), depósito de tratamiento de acero inoxidable (Figura 3, 5), transductor (Figura 3, 6), junta de aislamiento (Figura 3, 7), cerámicas (Figura 3, 8), salida para la toma de muestras (Figura 3, 9) y generador de ultrasonidos (Figura 3, 10). El equipo también contiene un manómetro y una sonda de temperatura (termopar tipo K) para medir la presión y temperatura del depósito de tratamiento, además de un sensor pt100 sumergido en el baño de agua termostático para medir la temperatura del agua. Estos sensores se conectaron a controladores digitales (E5CK, Omron, Hoofddorp, Países Bajos) (Gomez-Gomez et al., 2020).

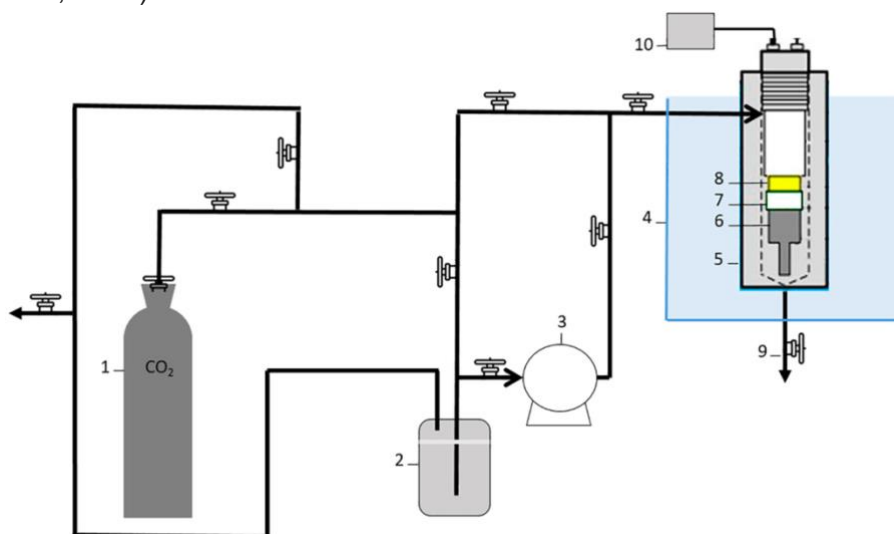


Figura 3. Esquema del equipo de CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos de alta potencia (SC-CO₂ + HPU). Figura extraída de Gomez-Gomez et al., 2020.

Para llevar a cabo el tratamiento, el CO₂ es conducido desde el tanque (Figura 3, 1) al depósito enfriador (Figura 3, 2). Después, la bomba alimenta el CO₂ líquido desde ahí hasta el depósito de tratamiento (Figura 3, 5), que consta de 600 mL de volumen interno y tiene en su tapa un transductor de ultrasonidos (Figura 3, 6). El sistema de HPU consiste en un transductor piezoeléctrico de alta potencia ($> 1\text{W/cm}^2$) compuesto por dos cerámicas comerciales (Figura 3, 8; ATU, España), un sonotrodo, un sistema de aislamiento y una unidad de generación de energía. La potencia es de $50\text{W} \pm 5\text{W}$ ($I = 250 \pm 10\text{mA}$; $U = 220 \pm 5\text{V}$), medida con un dispositivo digital medidor de potencia, modelo WT210 (Yogogawa, Japón) y la frecuencia es de $30 \pm 2\text{kHz}$.

Los ensayos realizados fueron de tipo discontinuo, por lo que la muestra a tratar se introducía en el depósito de tratamiento y se extraían muestras tras cada minuto durante los cinco minutos que dura el tratamiento. El sistema de HPU se encendía cuando se alcanzaba la presión requerida y a partir de ahí empezaba a contar el tiempo transcurrido. Durante todo el tratamiento, la presión y la temperatura se mantuvieron constantes y, tras él, las muestras eran depositadas en hielo para su análisis inmediato.

4.1.5. Esterilización de los equipos.

Los equipos se esterilizaban antes y después de cada tratamiento. En el caso del uso de PEF y HPU, se hacían pasar 400 mL de agua a aproximadamente 50°C, seguidos de 300 mL de una disolución de detergente-desinfectante industrial de superficies externas al 4% v/v (Diversey Detalled, Barcelona, España) y 200 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Luego, se introducía alcohol etílico de 96° (Scharlab S.L.; Mas d'En Cisa, España) y se dejaba dentro del equipo durante cinco minutos. Tras eliminar el alcohol del equipo se pasaban unos 400 mL de agua esterilizada en autoclave.

Por otra parte, el equipo de SC-CO₂ + HPU se desinfectó dejando la disolución de detergente-desinfectante al 4% v/v dentro del equipo durante 5 minutos. Después, el depósito de tratamiento se enjuagó dos veces con agua destilada y una vez con agua esterilizada en autoclave. Por último, se depositaba la muestra dentro del recipiente estéril y se sellaba y presurizaba inmediatamente.

4.1.6. Inactivación microbiana en muestras de leche de cabra y materna.

4.1.6.1. PEF.

En estos ensayos se mantuvieron constantes las variables de frecuencia y de ancho de pulso, en 50 Hz y 5 μ s, respectivamente. Por otra parte, las variables de voltaje (kV) y caudal (mL/min) se variaron en los diferentes tratamientos. La intensidad de campo (kV/cm) y la densidad de energía (kJ/L) a su vez dependen del voltaje y caudal. Las condiciones utilizadas en los ensayos y que se muestran en las Tablas 2 y 3 (leche de cabra y materna, respectivamente) fueron elegidas tras la puesta a punto del equipo explicada en el epígrafe anterior.

En todos los experimentos, las muestras de leche tratada se obtuvieron tras un minuto y medio, cuando la temperatura de salida ya se había estabilizado, y se envasaron en recipientes estériles para su posterior estudio microbiológico.

4.1.6.2. HPU.

De los ensayos programados, solamente se pudieron llevar a cabo dos, uno de ellos con leche de cabra y el otro con leche materna. Ambos fueron realizados a las mismas condiciones: empleando un caudal de 46.9 mL/min, con una potencia acústica de 400W y 24 kHz. El tiempo de residencia calculado fue de 44.19 segundos.

4.1.6.3. SC-CO₂ + HPU.

Se llevaron a cabo tres experiencias combinando diferentes temperaturas y presiones para ver el efecto de las variables sobre la inactivación de microorganismos en las muestras. Estos tres tratamientos fueron: uno a baja presión y temperatura (150 bar y 35°C), otro a alta presión y baja temperatura (350 bar y 35°C) y un último a baja presión y alta temperatura (150 bar y 50°C). Solo se trataron muestras de leche de cabra, pero es de esperar que la leche materna se comporte de la misma forma bajo este tratamiento.

4.1.7. Determinación de microorganismos mesófilos totales y enterobacterias.

Es importante tener en cuenta que las bacterias que se van a inactivar no son inoculadas, sino que se trabaja con la microbiota natural de las muestras empleadas. En este trabajo se analizaron tanto mesófilos aerobios como enterobacterias, aunque sólo estas últimas están contempladas en las normas microbiológicas de los alimentos. En estas, el límite máximo permitido de enterobacterias es de 10 UFC/mL (Reglamento CE nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento CE nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).

Para contabilizar la inactivación obtenida en cada uno de los tratamientos, se realizaron dos tipos de recuentos de microorganismos. Por un lado, el recuento de mesófilos aerobios viables se realizó mediante siembra en superficie en Plate Count Agar (PCA, Scharlab S.L.; Mas d'En Cisa, España) y, por otra parte, el recuento de enterobacterias se llevó a cabo mediante siembra en profundidad en Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBG, Scharlab S.L.; Mas d'En Cisa, España).

Se prepararon diluciones seriadas de las muestras y se cultivaron algunas de ellas dependiendo del tratamiento y del tipo de leche (Tabla 1). En el caso de la siembra en superficie, se vertió a la placa 100µL de la dilución con una micropipeta (Socorex Acura 825, 0.5-10 µL, Suiza) y se extendió con un asa de siembra Drigalski de plástico desechable (Scharlab S.L.; Mas d'En Cisa, España). En el caso de la siembra en profundidad, se vertió a una placa Petri (Scharlab S.L.; Mas d'En Cisa, España) vacía 100µL de la dilución con una micropipeta y se vertió medio VRBG estéril y atemperado a 40°C en un baño de agua (Precistern, J.P. Selecta, Abrera, España). Se realizaron las determinaciones por triplicado.

Tabla 1. Diluciones seriadas cultivadas para los diferentes tratamientos y las diferentes determinaciones microbiológicas en leche de cabra y materna.

<i>Tratamiento</i>	<i>Leche</i>	<i>Determinación microbiológica</i>	<i>Diluciones</i>
<i>PEF/HPU</i>	Cabra	Mesófilos aerobios	Natural: 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} Tratada: 10^{-1} , 1
<i>PEF/HPU</i>	Materna	Mesófilos aerobios	Natural: 10^{-2} , 10^{-1} Tratada: 10^{-1} , 1
<i>PEF/HPU</i>	Cabra/materna	Enterobacterias	Natural: 10^{-1} , 1 Tratada: 10^{-1} , 1
<i>SC-CO₂ + HPU</i>	Cabra/materna	Mesófilos aerobios	Natural: 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} Minuto 1: 10^{-2} , 10^{-1} , 1 Minutos 2, 3, 4 y 5: 10^{-1} , 1
<i>SC-CO₂ + HPU</i>	Cabra/materna	Enterobacterias	Natural: 10^{-1} , 1 Tratada: 10^{-1} , 1

Después, se incubaron en estufa (Bacteriological incubator "Incubat", J.P. Selecta, Abrera, España) a 35°C durante 24h. Tras pasar ese tiempo, se contaron las placas que

tenían un mínimo de 15 colonias y un máximo de 300 colonias (Vandevenne, 2002). Después del recuento, se calculó la población bacteriana inactivada tras cada tratamiento. En los ensayos en los que se consiguió inactivar por completo los microorganismos presentes se utilizó la Ecuación 4, en la cual se calcula la población bacteriana total presente en la muestra antes del tratamiento. Por otro lado, en los tratamientos en los que no se consiguió inactivar por completo los microorganismos presentes se utilizó la Ecuación 5, en la que se tiene en cuenta la diferencia entre los microorganismos presentes antes y después del tratamiento. Los resultados quedan expresados en ciclos logarítmicos (ciclos-log).

$$\text{Inactivación total } (\log_{10}) = -\log_{10}(N_0) \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde N_0 es la población bacteriana presente en la muestra antes del tratamiento (UFC/mL).

$$\text{Inactivación parcial } (\log_{10}) = \log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde N_0 es la población bacteriana presente en la muestra antes del tratamiento (UFC/mL) y N es la población bacteriana presente después del tratamiento (UFC/mL).

4.1.8. Análisis estadístico.

Debido a la crisis sanitaria resultado del SARS-CoV-2 y, en consecuencia, la interrupción del trabajo en los laboratorios, no ha sido posible obtener un número de observaciones suficiente para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados derivados de los tratamientos con PEF y HPU. Sin embargo, en el caso del tratamiento mediante SC-CO₂ + HPU sí se han logrado resultados suficientes para realizar este análisis.

En el desarrollo del análisis estadístico se ha utilizado el programa Statgraphics Centurion XVII (Statgraphics Technologies, Inc., Virginia, USA). Para ello, se ha llevado a cabo un ANOVA multifactorial con el objetivo de determinar si la presión, temperatura, y tiempo de tratamiento determinan de manera significativa la inactivación sufrida en las muestras de leche de cabra tratadas con SC-CO₂ + HPU.

4.2. Resultados y discusión.

4.2.1. PEF.

Relación entre el caudal y la velocidad de la bomba

Se vieron caudales muy similares (datos no mostrados) para las dos temperaturas (25 y 30°C), por lo que la temperatura a la que se introdujo la muestra no tuvo un efecto significativo sobre el caudal. Se decidió por tanto que las muestras se introducirían a 30°C. Por otra parte, se observaron caudales similares tanto si se utilizaba leche de cabra como si se utilizaba leche materna, por lo que se empleó una única recta de calibración (Figura 4) entre el caudal y la velocidad de la bomba para ambos tipos de leche. A partir de esta recta de calibración se calcularon los caudales utilizados.

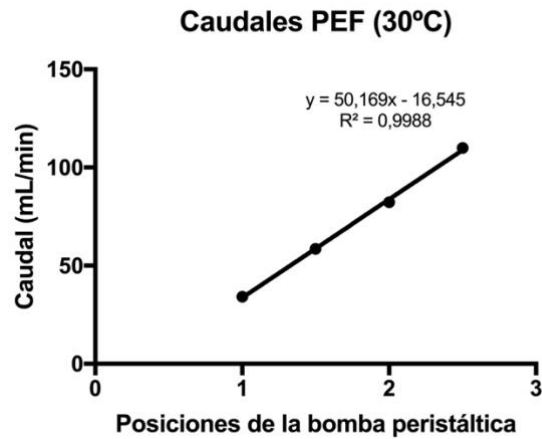


Figura 4. Relación entre el caudal obtenido para la leche de cabra y materna a 30°C en el equipo de PEF y la velocidad de la bomba.

Temperaturas alcanzadas

Como era de esperar, se observó que los tratamientos que alcanzaban una mayor temperatura eran en los que se aportaba mayor densidad de energía, y que ésta es dependiente de factores como la intensidad de campo y el caudal (Figura 5). Esto también es posible observarlo al representar la relación entre la temperatura final y la densidad de energía (Figura 6), en la que se confirma la existencia de una relación lineal entre ambas. Por otra parte, en cuanto a las temperaturas alcanzadas con respecto a la densidad de energía no se vieron grandes diferencias entre los diferentes tipos de leche (Figuras 5 y 6), por lo que, dado que la temperatura alcanzada depende del calor específico de cada tipo de leche, en el caso de la leche materna y la leche de cabra, deben ser similares.

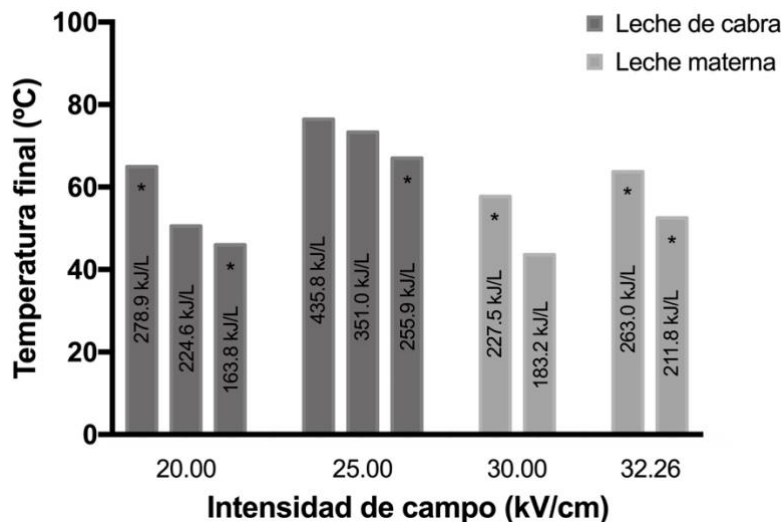


Figura 5. Relación entre la temperatura final (°C) y las distintas condiciones de intensidad de campo (kV/cm) y densidad de energía (kJ/L). Las condiciones utilizadas en los experimentos de inactivación se encuentran marcadas con un asterisco (*).

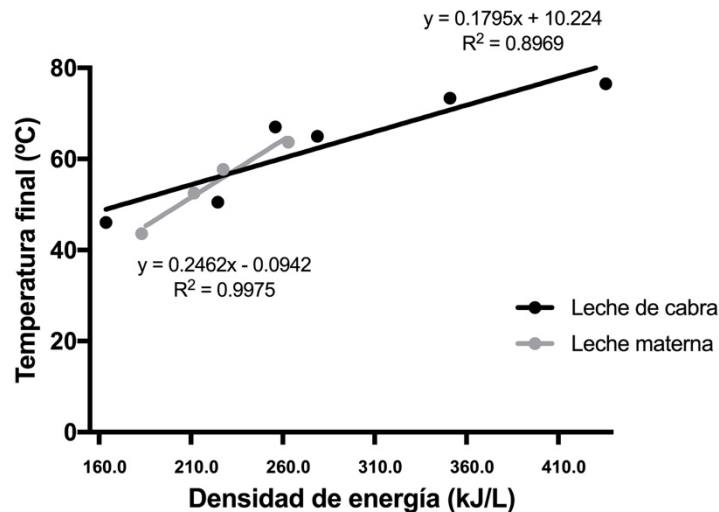


Figura 6. Relación entre la temperatura final (°C) y la densidad de energía (kJ/L) en leche de cabra y leche materna.

Tras estudiar las relaciones entre los diferentes parámetros y lo que estos implican en cuanto a la temperatura final, se decidió elegir tres condiciones para cada uno de los tipos de leche, marcados con un asterisco en la Figura 5. Se seleccionaron tres de cada uno con el objetivo de estudiar los efectos provocados en cuanto a inactivación y, dependiendo de los resultados que se obtuvieran, elegir el mejor de ellos teniendo en cuenta tanto la inactivación producida como la temperatura alcanzada, ya que no se pretende llevar a cabo un tratamiento térmico sobre la leche.

En el caso de la leche de cabra se eligieron condiciones con una densidad de energía moderada (163.8 kJ/L, 255.9 kJ/L y 278.9 kJ/L), ya que no se quería trabajar con temperaturas muy altas para no provocar daños en ella. Por otro lado, en cuanto a la leche humana se decidió utilizar las condiciones que ofrecían las mayores densidades de energía (211.8 kJ/L, 227.5 kJ/L y 263 kJ/L) con el objetivo de trabajar a temperaturas similares a las que obtendríamos con la leche de cabra.

Inactivación de la microbiota

En leche de cabra se ha visto que los tratamientos con una intensidad de campo de 25 kV/cm y una densidad de energía de 255.9 kJ/L (Tabla 2, tratamientos 1, 2 y 3) consiguen una inactivación de mesófilos aerobios de entre 1.43 y 5.12 ciclos-log, mientras que inactivan de manera notable las enterobacterias presentes. La variabilidad obtenida en los resultados en cuanto a inactivación es debida a que se partió de concentraciones microbianas distintas antes del tratamiento. En las muestras en las que se produjo una mayor inactivación de mesófilos aerobios (3.65 y 5.12 ciclos-log) había una concentración inicial de microorganismos del orden de 10^5 y 10^6 UFC/mL respectivamente, mientras que en la muestra en la que se obtuvo una menor inactivación (1.43 ciclos-log) se partió de una muestra con una concentración inicial de microorganismos de 10^3 UFC/mL. En el caso de las enterobacterias, en el tratamiento 3 se inactivaron 2.62 ciclos-log, pero en los tratamientos 1 y 2 no fue posible contabilizar la concentración antes del tratamiento dado que no se pudo ensayar la dilución adecuada y el número de microorganismos por placa era excesivo, por lo que no se

pudo determinar la reducción microbiana. A pesar de esto, se pudo contabilizar las enterobacterias que quedaron en la muestra tras el procesamiento. En el tratamiento 1 el recuento fue de 50 UFC/mL, mientras que en el tratamiento 2 fue de 5 UFC/mL. Este último se encuentra por debajo del límite legal (10 UFC/mL), explicado en el apartado 4.1.7. Sin embargo, en los tres tratamientos se consiguió reducir la carga microbiana de manera apreciable.

Por otra parte, en el tratamiento con las condiciones de intensidad de campo de 20 kV/cm y densidad de energía de 163.8 kJ/L (Tabla 2, tratamiento 4) no se ha registrado inactivación para ninguno de los microorganismos, por lo que se podría afirmar que, en estas condiciones, el tratamiento no es efectivo para la pasteurización de leche de cabra. Al ver que ese tratamiento no era satisfactorio, se bajó el caudal a 45.6 mL/min manteniendo la intensidad de campo a 20 kV/cm, lo que aumentó la densidad de energía a 278.9 kJ/L (Tabla 2, tratamiento 5), observándose que, con estas condiciones, se mejoraban significativamente los resultados. En el caso de los mesófilos aerobios se consiguió inactivar 4.61 ciclos-log y en el de las enterobacterias se produjo una inactivación notable. De igual manera que con los tratamientos 1 y 2, tampoco fue posible contabilizar la reducción microbiana. Sin embargo, el recuento tras el tratamiento fue de 2.5 UFC/mL, valor inferior al límite legal (10 UFC/mL).

Estos resultados sugieren que este tratamiento podría ser válido para pasteurizar la leche de cabra, pero es necesaria más investigación al respecto para asegurar que se alcanzan unas condiciones microbiológicas adecuadas.

Tabla 2. Inactivación de la microbiota de leche de cabra mediante tratamientos de PEF.

Número de tratamiento	Caudal (mL/min)	Voltaje (kV)	Intensidad de campo (kV/cm)	Densidad de energía (kJ/L)	Inactivación mesófilos aerobios ($\log_{10} (N_0/N)$)	Inactivación enterobacterias ($\log_{10} (N_0/N)$)
1	77.8	7.75	25	255.9	3.65	*
2	77.8	7.75	25	255.9	5.12	*
3	77.8	7.75	25	255.9	1.43	2.61 (total)
4	77.8	6.20	20	163.8	0	0
5	45.7	6.20	20	278.9	4.61	*

* No fue posible cuantificar la reducción microbiana.

En el caso de la leche materna, se estudiaron tres tratamientos diferentes (Tabla 3). Dos de ellos se llevaron a cabo con una intensidad de campo de 32.3 kV/cm, el primero con una densidad de energía de 211.8 kJ/L (Tabla 3, tratamiento 6) y el segundo con una densidad de energía de 263 kJ/L (Tabla 3, tratamiento 7), encontrándose una inactivación de mesófilos aerobios de 1.57 y 3.63 ciclos-log, respectivamente. La inactivación de enterobacterias no fue posible contabilizarla en estos tratamientos porque las muestras de leche empleada para el tratamiento carecían de ellas. En este tratamiento se vio que, como se esperaba, al bajar el caudal (aumento de la densidad de energía), para la misma intensidad de campo, aumentaba la inactivación. De igual manera, se esperaba que al bajar el voltaje para el mismo caudal disminuyera la

inactivación, por lo que se realizó un tercer tratamiento a una intensidad de campo de 30 kV/cm y densidad de energía de 227.5 kJ/L (Tabla 3, tratamiento 8). En éste se cuantificó una inactivación de mesófilos aerobios de 4.11 ciclos-log y de enterobacterias de 2.27 ciclos-log, que fue superior a los resultados que esperábamos obtener. Estas diferencias en las inactivaciones pueden ser explicadas por la variabilidad experimental, ya que las muestras proceden de diferentes madres y por tanto poseen diferentes concentraciones iniciales de bacterias y hasta composición. Además, en esta muestra también advertimos presencia de enterobacterias, las cuales generalmente no están presentes en la leche materna. No obstante, los resultados de inactivación obtenidos muestran que, en caso de que las hubiera en otras muestras, estas también serían inactivadas.

Tabla 3. Inactivación de la microbiota de leche materna mediante tratamientos de PEF.

Número de tratamiento	Caudal (mL/min)	Voltaje (kV)	Intensidad de campo (kV/cm)	Densidad de energía (kJ/L)	Inactivación mesófilos aerobios ($\log_{10}(N_0/N)$)	Inactivación enterobacterias ($\log_{10}(N_0/N)$)
6	56.7	10	32.3	211.8	1.57	No había enterobacterias
7	45.7	10	32.3	263	3.63	No había enterobacterias
8	45.7	9.3	30.0	227.5	4.11	2.27 (total)

Los diferentes estudios que se han llevado a cabo sobre esta técnica sostienen que es un procedimiento que puede ofrecer productos lácteos seguros y estables, con una vida útil prolongada y mejores propiedades sensoriales y nutricionales, ya que las temperaturas alcanzadas son menores que en los tratamientos térmicos y los tiempos de residencia son bajos. Así se consigue no perder tantas propiedades, tanto sensoriales como funcionales, en comparación con la pasteurización convencional.

En cuanto a los resultados de los tratamientos, puede ser difícil extrapolar las conclusiones obtenidas entre diferentes trabajos (Soliva-Fortuny et al., 2009), ya que cada grupo de investigación utiliza equipos, condiciones y productos diferentes. Con el objetivo de poder comparar resultados, se ha intentado tomar el parámetro de densidad de energía (kJ/L) como factor de control del tratamiento de PEF, aunque en muchos artículos no está descrito. Se trata de un parámetro integral que tiene en cuenta las variables más importantes del proceso, como la intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la conductividad del medio a tratar (Mendes-Oliveira et al., 2020). Por otro lado, el producto que se trata también puede influir significativamente en los resultados. Algunos estudios reportan que la grasa y otros componentes pueden tener un efecto protector de los microorganismos frente a los PEF (Martín et al., 1997; Min et al., 2002), aunque otros estudios dicen que no existe una relación significativa entre la composición y una menor efectividad del tratamiento (Dutreux et al., 2000; Reina et al., 1998). Por último, existen otros trabajos que ponen de manifiesto la necesidad de más investigación al respecto, ya que todavía no se pueden obtener conclusiones claras y fiables (Manas y Pagán, 2005).

En la literatura se ha registrado que tratamientos de pasteurización de leche con condiciones de entre 30 y 35 kV/cm y tiempo de residencia de 40 μ s (densidad de energía de entre 120 y 240 kJ/L) dan una temperatura final de alrededor de 60°C y son capaces de conseguir una inactivación mayor a 4 ciclos-log de microorganismos como *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus*, *Listeria spp.* y bacterias ácido lácticas; todo ello sin producir grandes efectos negativos en las propiedades organolépticas y nutritivas (Buckow et al. 2014). Este tratamiento se correspondería aproximadamente con el tratamiento realizado en leche materna con una intensidad de campo de 30 kV/cm y una densidad de energía de 227.5 kJ/L (Tabla 3, tratamiento 8), en el que se consiguieron inactivaciones de 4.11 ciclos-log en mesófilos aerobios e inactivación total en enterobacterias (2.27 ciclos-log), obteniendo una temperatura final alrededor de los 60°C. Ya que en el trabajo de Buckow et al. (2014) no se vieron prácticamente efectos negativos y se han obtenido buenos resultados en cuanto a inactivación, estas condiciones podrían ser buenas candidatas para continuar los ensayos con esta tecnología.

Como se ha mencionado anteriormente, la temperatura es muy importante para la inactivación microbiana mediante PEF. Es por esto que varios grupos de investigación han estudiado la viabilidad de la inactivación microbiana con bajas temperaturas finales, obteniendo en alimentos líquidos inoculados una reducción de hasta 6 ciclos-log con una intensidad de campo de 60 kV/cm y sin superar los 40°C (Qin et al., 1998).

En el caso de este trabajo, los mejores resultados se obtuvieron a temperaturas más altas de 40°C, las cuales corresponden a densidades de energía moderadas como 255.9 kJ/L y 278.9 kJ/L (Figura 5). Además, se ha comprobado que cuando se llevan a cabo estos tratamientos con la muestra a una temperatura moderada (entre los 50 y 60°C) se consiguen inactivaciones más altas. Por ejemplo, según Buckow et al. (2014), en tratamientos con leche a diferentes temperaturas (entre 15 y 40°C y entre 50 y 55°C) para las mismas condiciones (31 kV/cm, 139.4 kJ/L y tiempo de residencia de 19.2 μ s) se vieron grandes diferencias, consiguiendo la mayor inactivación, de 5 ciclos-log, a 55°C. Por otra parte, estos mismos autores comprobaron que el tratamiento de la misma muestra sólo con temperatura dio lugar a una inactivación de 0.2 ciclos-log, por lo que se concluyó que la inactivación no era debida al aumento de temperatura, sino al efecto sinérgico de los PEF con las temperaturas moderadas. Estos mismos resultados se han observado en otros estudios, reportando un aumento de más de 1 ciclo-log al aumentar la temperatura de 25°C a 50°C para un mismo tratamiento (Reina et al., 1998). Algunos grupos de investigación relacionan la mejor inactivación al aumentar la temperatura con una disminución en el potencial de ruptura eléctrica de la membrana, por lo que aumenta la fluidez de la membrana, viéndose afectada su estabilidad física y disminuyendo el valor de campo eléctrico crítico mencionado anteriormente (Sampedro, 2008). Por tanto, es posible afirmar que, alcanzar temperaturas relativamente altas en estos tratamientos permite conseguir una mayor inactivación y mejores resultados con menor tiempo de residencia.

También se ha visto que esta combinación de temperaturas moderadas y PEF aumentan la vida útil de la leche hasta 24 días, lo que la iguala al tiempo de vida útil de la leche comercial pasteurizada. Si a esto se le añade que el tratamiento de PEF con temperaturas moderadas permite un ahorro de energía notable cuando es comparado

con los tratamientos convencionales de pasteurización térmica de leche, se convierte en un candidato muy competitivo frente a estos últimos (Sepúlveda et al., 2009).

4.2.2. HPU.

Relación entre el caudal y la velocidad de la bomba

Se obtuvieron caudales prácticamente iguales para la leche de cabra y la leche materna (datos no mostrados), por lo que es posible afirmar que su comportamiento de flujo es similar en el sistema de HPU. Por lo tanto, se empleó una única recta de calibración (Figura 7) entre el caudal y la velocidad de la bomba para ambos tipos de leche.

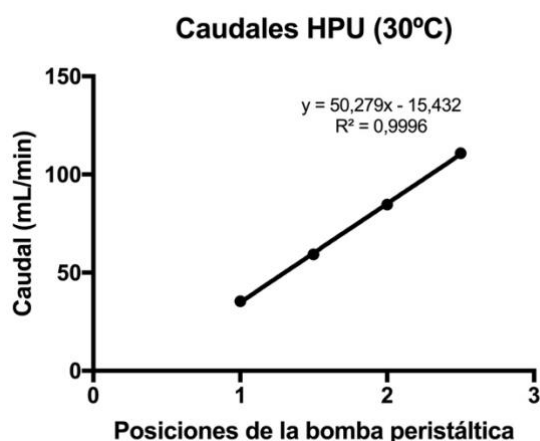


Figura 7. Relación entre el caudal obtenido para la leche de cabra y materna a 30°C en el equipo de HPU y la velocidad de la bomba.

Inactivación de la microbiota

En el tratamiento de leche de cabra se llegó a una temperatura final de 53.2°C y se consiguió una inactivación de mesófilos aerobios de 0.50 ciclos-log, mientras que de enterobacterias se consiguió una inactivación de 0.66 ciclos-log. Por otra parte, en el tratamiento de leche materna a las mismas condiciones se alcanzó una temperatura final de 52.9°C y se registró una inactivación de mesófilos aerobios de 0.69 ciclos-log. La inactivación de enterobacterias no fue posible contabilizarla porque la muestra inicial carecía de ellas.

En otros estudios, se ha visto que los ultrasonidos combinados con temperaturas no muy altas aumentan el poder de inactivación del tratamiento. En un ensayo en el que leche cruda de procedencia animal no inoculada era recirculada durante 18 minutos con condiciones de 20 kHz y 150 W, se vio un aumento de la inactivación de 3.13 a 4.82 ciclos-log aumentando la temperatura de salida de 20°C a 57°C (D'Amico et al., 2006). Esto también se ha observado en productos no lácteos, como zumos de diferentes frutas inoculados en los que se obtuvieron mejores resultados a 60°C que a 40°C o a 50°C (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2012) o caldos de cultivo inoculados en los que se ha observado un aumento de 2.5 ciclos-log en la inactivación de *P. fluorescens* inoculada tras aumentar la temperatura de 43.1°C a 61.6°C. Este efecto se ve también

para *S. thermophilus*, pero de manera más atenuada, posiblemente debido a que se trata de una bacteria termófila (Villamiel y Jong, 2000).

La temperatura final del producto tratado será mayor cuanto mayor sea el tiempo de residencia. En el caso expuesto en este trabajo, la temperatura final del producto fue de alrededor de 53°C tras un tiempo de residencia de 44.19 segundos, consiguiendo inactivaciones de entre 0.50 y 0.69 ciclos-log. En un ensayo similar en el que se trató leche cruda de vaca sin inocular, se reportó una inactivación de 0.2 ciclos-log tras 34.1 segundos y temperatura final de 48.6°C, y de 0.6 ciclos-log tras 56.3 segundos y temperatura final de 62.0°C (Villamiel y Jong, 2000). Comparando ambos estudios, se observa que en el presente trabajo se han obtenido prácticamente los mismos resultados en menos tiempo, por lo que se sugiere que se podría mejorar la inactivación obtenida aumentando el tiempo de residencia mediante el empleo de un conjunto de celdas de tratamiento en serie.

No se han realizado muchos estudios empleando ultrasonidos de potencia como tratamiento de inactivación en leche, y la mayoría de ellos son de tipo discontinuo, pero se ha demostrado que un sistema de flujo continuo presenta beneficios como la mejor homogeneización del producto resultante y un menor consumo de energía frente al discontinuo (Piyasena et al., 2003). Por tanto, el tratamiento de tipo continuo de leche con ultrasonidos de potencia podría ofrecer ventajas no sólo en cuanto a las propiedades nutricionales y organolépticas, sino también suponiendo un procesamiento más sostenible.

4.2.3. SC-CO₂ + HPU.

Estos ensayos se realizaron con leche de cabra y se llevaron a cabo tres tratamientos, variando la presión y temperatura.

Mesófilos aerobios

En el tratamiento a baja presión y temperatura (150 bar y 35°C), los mesófilos aerobios sufrieron una inactivación progresiva hasta llegar a su totalidad (4.72 ciclos-log) en el minuto 5 (Figura 8).

En el caso de la condición de alta presión y baja temperatura (350 bar y 35°C), los mesófilos aerobios se inactivaron totalmente (4.39 ciclos-log) en el minuto 4 (Figura 8). Comparándolo con la condición anterior, se vio que al aumentar la presión se conseguía una inactivación más temprana, suponiendo un minuto menos de tratamiento.

Por último, al aumentar la temperatura a 50°C manteniendo la presión a 150 bar se vio que los mesófilos aerobios eran inactivados totalmente (4.35 ciclos-log) en el minuto 2 (Figura 8), reduciendo así notablemente el tiempo de tratamiento y consiguiendo la misma inactivación (total) que en las condiciones anteriores.

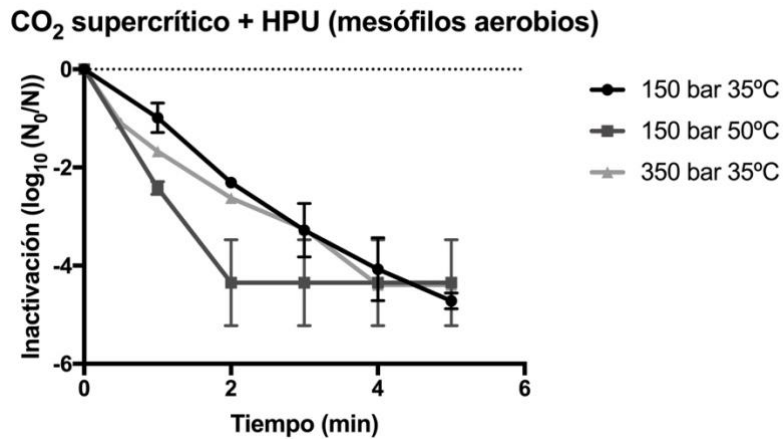


Figura 8. Inactivación de mesófilos aerobios con tratamientos de SC-CO₂ + HPU a tres condiciones de presión y temperatura diferentes.

Enterobacterias

Bajo la condición de baja presión y temperatura (150 bar y 35°C), se vio una inactivación rápida de las enterobacterias (Figura 9), ya que en el minuto 2 ya se había conseguido una inactivación total (3.3 ciclos-log).

En el tratamiento de 350 bar a 35°C, las enterobacterias se inactivan totalmente (2.86 ciclos-log) en el minuto 1 (Figura 9), produciéndose por tanto la inactivación en un menor tiempo de tratamiento que con la condición anterior.

Por último, al aumentar la temperatura, manteniendo la presión baja (150 Bar y 50°C), las enterobacterias fueron inactivadas totalmente (3.29 ciclos-log) en el minuto 2 (Figura 9), obteniendo en consecuencia un resultado similar a la condición de baja presión y temperatura.

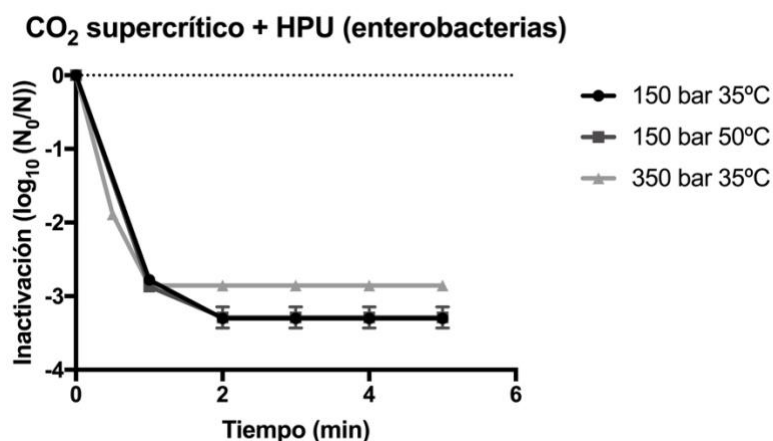


Figura 9. Inactivación de enterobacterias con tratamientos de SC-CO₂ + HPU a tres condiciones de presión y temperatura diferentes.

En todas las muestras se puede ver que hay más mesófilos aerobios que enterobacterias, y que estas últimas se inactivan totalmente en un tiempo menor que los primeros.

En el caso de los mesófilos aerobios, el tratamiento más eficaz es el de bajas presiones y alta temperatura (150 bar y 50°C), en el que se consigue inactivación total tras 2 minutos de tratamiento (Figura 8). Esto se puede corroborar con el análisis estadístico realizado, en el que se ve un efecto significativo de la temperatura a la cual se lleva a cabo el tratamiento ($p < 0.05$), como se observa en la Figura 10. Asimismo, el análisis confirma que la presión aplicada en el tratamiento no presenta un efecto significativo sobre el resultado de inactivación ($p > 0.05$, Figura 11). Por último, el tiempo de tratamiento también ejerce un efecto significativo ($p < 0.05$) en la inactivación resultante. En los ensayos se ha visto que en el minuto dos ya se produce inactivación total, hecho que se reafirma en el análisis estadístico realizado. En él, se ven tres grupos homogéneos diferenciados según el tiempo de tratamiento (Figura 12): por un lado hasta el minuto 1, por otro lado desde el minuto 2 al 3, y por último del minuto 4 al 5.

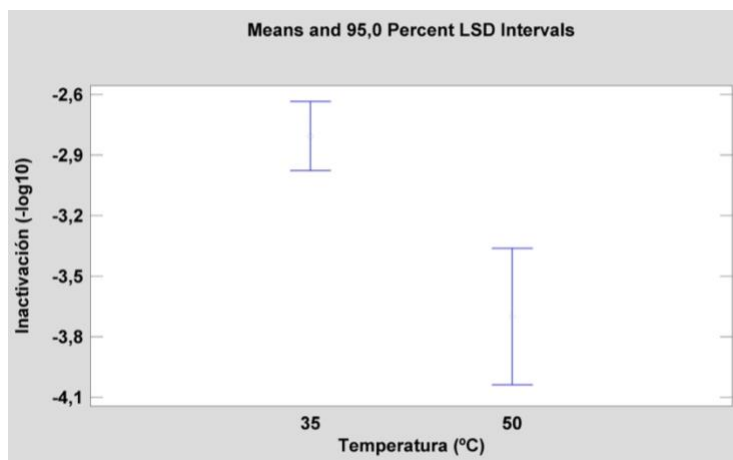


Figura 10. Medias e intervalos LSD de la inactivación de mesófilos aerobios en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes temperaturas.

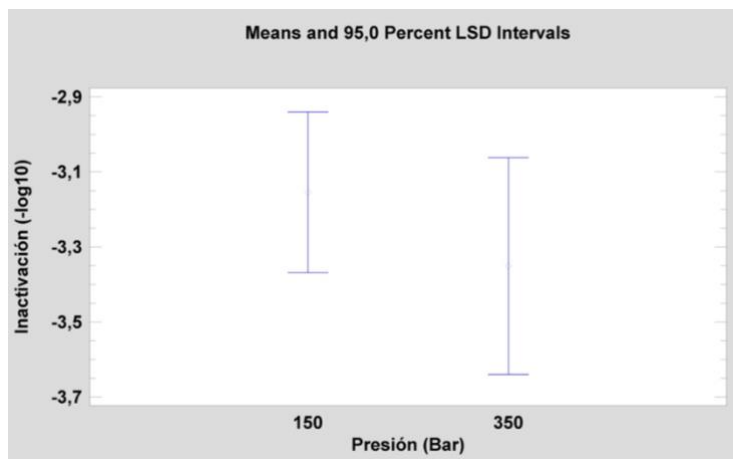


Figura 11. Medias e intervalos LSD de la inactivación de mesófilos aerobios en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes presiones.

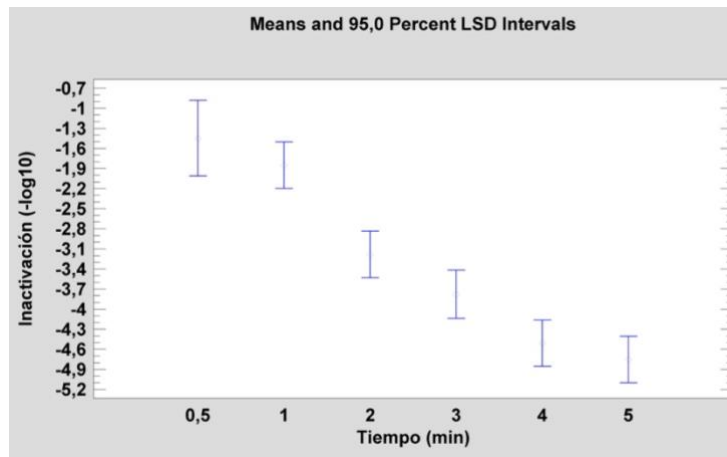


Figura 12. Medias e intervalos LSD de la inactivación de mesófilos aerobios en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes tiempos de tratamiento.

Por otro lado, en cuanto a las enterobacterias, es más eficaz el tratamiento con la presión más alta a baja temperatura (350 bar y 35°C), ya que la inactivación total ocurre en el primer minuto (Figura 9). Esto se confirma en el análisis estadístico, en el cual la presión a la que se desarrolla el tratamiento presenta un efecto significativo sobre la inactivación de las enterobacterias ($p < 0.05$) y, por el contrario, la temperatura no produce un efecto significativo en la inactivación final ($p > 0.05$). Esto se aprecia en las Figuras 13 y 14, que representan las medias e intervalos LSD para un valor de confianza del 95% de la variable presión y la variable temperatura, respectivamente. De igual manera, en el análisis estadístico se confirma que el tiempo que dura el tratamiento también tiene efecto significativo sobre el resultado final ($p < 0.05$), resultando dos grupos homogéneos que se pueden distinguir fácilmente en la Figura 15: por una parte hasta el minuto 0.5 de tratamiento y por otra parte desde el minuto 1 hasta el minuto 5 de tratamiento. Esto refleja lo que ya se ha visto en los resultados presentados: la inactivación total de las enterobacterias en el primer minuto mediante este tratamiento.

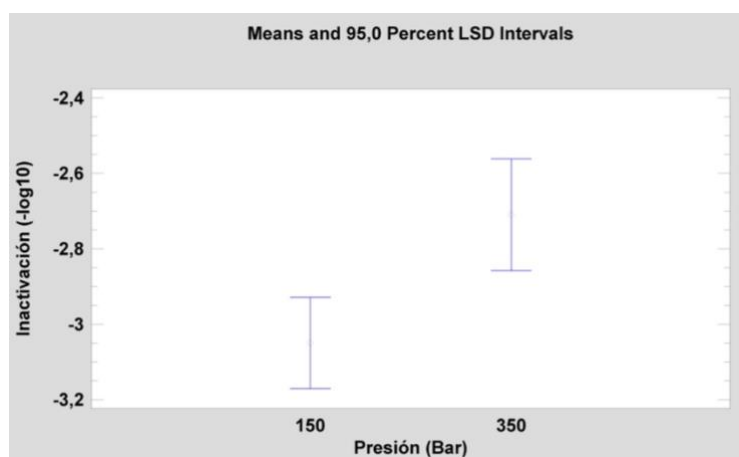


Figura 13. Medias e intervalos LSD de la inactivación de enterobacterias en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes presiones.

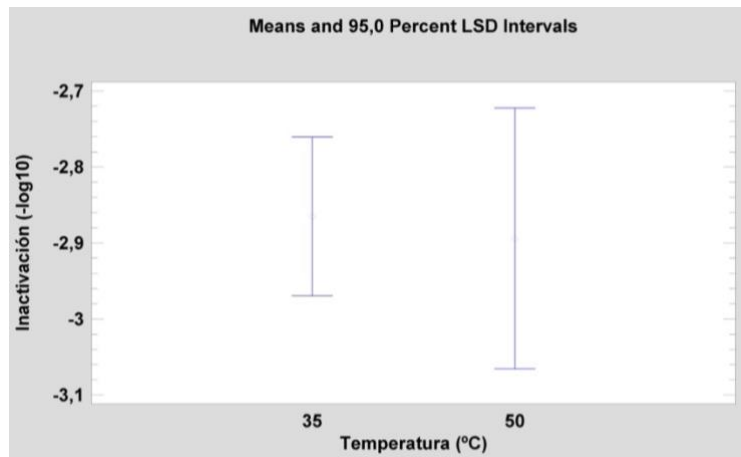


Figura 14. Medias e intervalos LSD de la inactivación de enterobacterias en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes temperaturas.

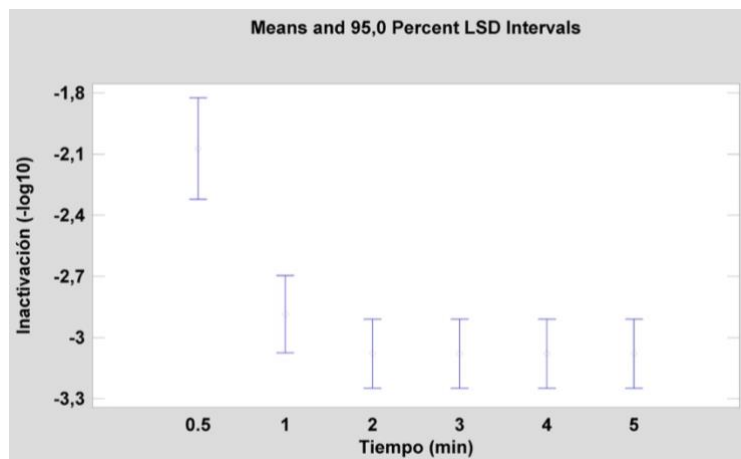


Figura 15. Medias e intervalos LSD de la inactivación de enterobacterias en leche de cabra mediante SC-CO₂ + HPU a diferentes tiempos de tratamiento.

A nivel global, el tratamiento de baja presión y alta temperatura (150 bar y 50°C) es el que ofrece un mejor resultado, ya que se consigue inactivar todos los microorganismos en el minuto 2 (Figuras 8 y 9). Sin embargo, faltaría probar un último tratamiento a alta presión y a alta temperatura (350 bar y 50°C) para comprobar si con esta combinación se consiguen mejores resultados y una inactivación más rápida de toda la población bacteriana.

En los tres tratamientos realizados, las muestras de leche no sufrieron un aumento de temperatura, por lo que es de esperar que no se vean afectadas sus propiedades organolépticas, ofreciendo una gran ventaja con respecto a los tratamientos tradicionales.

En cuanto a la inactivación de microorganismos, la combinación de fluidos supercríticos con ultrasonidos de potencia es una técnica muy novedosa, de manera que no hay muchos artículos publicados que utilicen este tratamiento. Sin embargo, múltiples estudios han demostrado la eficacia de los fluidos supercríticos a la hora de inactivar

poblaciones bacterianas, por lo que se comparará en primer lugar los resultados obtenidos en este trabajo con los de SC-CO₂ presentes en la literatura. Oulé et al. (2006) reportó la reducción de *E. coli* (enterobacteria) en 1 ciclo-log tras un tratamiento de 11 minutos a 120 bar y 40°C. Al aumentar la presión a 250 bar manteniendo la temperatura a 40°C, se vio que el tiempo para conseguir la inactivación de un ciclo-log se reducía a 6 minutos. Manteniendo estas últimas condiciones durante 30 minutos, se llegó a inactivar hasta 6 ciclos-log.

Por otra parte, se consiguió la inactivación de 8 ciclos-log de *L. monocytogenes* (mesófilo aerobio) tras 120 minutos de tratamiento a una presión de 200 bar y temperatura de 33°C (Soares et al., 2013). En otro estudio relevante realizado por Spilimbergo et al. (2007) se llevó a cabo un tratamiento a 100 bar y 36°C sobre una población de *S. cerevisiae* (mesófilo aerobio), consiguiendo una reducción en la población de 4.6 ciclos-log tras 50 minutos.

Es posible ver que los tiempos de tratamiento son más altos que los obtenidos en los ensayos desarrollados en este trabajo para unas condiciones de tratamiento similares. Esta reducción en los tiempos es debida a la combinación de CO₂ supercrítico con ultrasonidos de potencia, que se puede ver también en otros estudios publicados. En este sentido, resulta interesante un ensayo sobre poblaciones bacterianas de *E. coli* (enterobacteria) y *S. cerevisiae* (mesófilo aerobio) inoculadas en medios de cultivo LB e YPD Broth (Ortuño et al., 2014). En el caso de *E. coli* se alcanzó una reducción de 0.3, 0.9 y 8 ciclos-log tras 5 minutos de tratamiento con CO₂ supercrítico, ultrasonidos y la combinación de ambos respectivamente. Por otro lado, en el caso de *S. cerevisiae* se consiguió una reducción de 6.83 ciclos-log tras 2 minutos de tratamiento combinado, mientras que en el mismo tiempo con solo CO₂ supercrítico o solo ultrasonidos no se reportó ninguna reducción en la población bacteriana. Por otra parte, en un tratamiento de zumo de manzana inoculado con *S. cerevisiae* (mesófilo aerobio) también se han visto diferencias entre estas dos técnicas, consiguiendo para condiciones de 200 bar, 36°C y tiempo de residencia de 3.1 minutos una inactivación de 4.3 ciclos-log sólo con SC-CO₂, frente a los 6.8 ciclos-log logrados al utilizar la combinación de ambas técnicas (Paniagua-Martínez et al., 2016). En el caso de *S. cerevisiae* (mesófilo aerobio) inoculado en YPD Broth y zumo de naranja y manzana se vio que eran necesarios 50 minutos para inactivar 8 ciclos-log a presión de 350 bar y temperatura de 36°C al tratar con SC-CO₂, mientras que suplementando el tratamiento con HPU el tiempo se reducía a 2 minutos para la misma inactivación (Ortuño et al., 2012). Estos resultados de diferentes estudios refuerzan que el tratamiento con CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos de potencia mejora la inactivación en muestras de diferente procedencia, tanto con bacterias inoculadas como con microbiota natural, que sería el caso que se expone en este trabajo.

Además, este efecto sinérgico se ha visto que aumenta con la temperatura y la presión, tanto para enterobacterias (*E. coli*) como para mesófilos aerobios (*S. cerevisiae*) (Ortuño et al., 2014). Se observó que para el mismo tratamiento a 31-36°C se producía una inactivación total (7-8 ciclos-log) tras 7 minutos y al aumentar la temperatura a 40°C ésta se producía en tan sólo 3 minutos. De igual manera, para una misma temperatura tras 1 minuto de tratamiento se consiguió inactivar 2.5 ciclos-log a 100 bar, 4.6 ciclos-log a 225 bar y 5.4 ciclos-log a 350 bar. Esto se refleja en el estudio llevado a cabo, dado que se ha visto que la inactivación aumenta al incrementar la temperatura en el caso de los mesófilos aerobios y la presión en el caso de las enterobacterias. Sin embargo, cabrá

comprobar si al aumentar ambas condiciones mejora aún más la inactivación o si hay un factor más importante que otro y sólo es necesario aumentar una de ellas.

Por tanto, es posible afirmar que, con el objetivo de inactivar microorganismos en leche, la combinación de fluidos supercríticos con ultrasonidos de potencia es mucho más efectiva que el tratamiento con sólo fluidos supercríticos. Según Ortuño et al., la aplicación de ultrasonidos de potencia mejora la inactivación ya que acelera la solubilización de CO₂ en el medio, facilitando así la entrada de este en las células microbianas y acelerando su muerte. Además, esta tecnología proporciona un tiempo de vida útil de la leche cruda mayor a 35 días y mejores propiedades organolépticas que la misma leche tratada mediante procedimientos térmicos (Giacomo et al., 2009), por lo que ofrece una ventaja competitiva frente a estos últimos.

Si se comparan los diferentes métodos tratados en este trabajo, en la literatura se puede observar que todos presentan características interesantes y que alguno de ellos podría sustituir en un futuro próximo los tratamientos térmicos convencionales. Sin embargo, es necesario estudiar los efectos de cada tratamiento de manera individual para cada alimento ya que estos poseen características diferentes. En el caso de la leche, con PEF ha sido posible conseguir inactivaciones de entre 1.43 y 4.62 ciclos-log en mesófilos aerobios e inactivación notable en enterobacterias, resultados que son alentadores ya que se consigue un producto final con concentraciones de microorganismos más bajas que el límite legal establecido. Por otro lado, con HPU no se han conseguido buenos resultados, ya que sólo se han obtenido reducciones en la población bacteriana menores a 0.7 ciclos-log. No obstante, el tratamiento más prometedor ha sido el de SC-CO₂ + HPU, en el que se ha conseguido inactivación total de todos los microorganismos en tan sólo 2 minutos y sin elevar la temperatura del producto, por lo que resulta muy interesante continuar su estudio y su puesta a punto para la pasteurización de leche materna y comercial. Asimismo, es de interés continuar el estudio del efecto de estos tratamientos sobre la composición nutricional, componentes bioactivos, conformación y propiedades organolépticas de la leche.

5. Conclusiones.

1. Es necesario desarrollar nuevos métodos de procesado de alimentos que aseguren propiedades nutricionales y organolépticas óptimas, concretamente en el campo de la leche materna y comercial.
2. Actualmente, existen varios métodos no térmicos interesantes, pero es necesaria su optimización y puesta a punto en los diferentes productos para asegurar alimentos con las características y estabilidad óptimas.
3. Está cobrando importancia el estudio de combinaciones de diferentes métodos no térmicos para describir los efectos sinérgicos que muestran e investigar si son útiles para la pasteurización de leche.
4. En este trabajo, los tratamientos con PEF han aportado buenos resultados, pero es necesario continuar su investigación ya que no se cuenta con suficiente

evidencia estadística para poder afirmar con seguridad que alguno de estos tratamientos sea válido para pasteurizar leche.

5. Sobre el tratamiento con HPU no es posible realizar afirmaciones ya que no se dispone de suficiente evidencia estadística, pero en base a los resultados preliminares, no parece ser un método útil para la pasteurización de leche.
6. La combinación de CO₂ supercrítico con ultrasonidos de potencia ha demostrado poseer un efecto sinérgico y proporcionar resultados muy prometedores en cuanto a la pasteurización de leche, reduciendo en gran medida el tiempo de tratamiento sin aumentar la temperatura del producto.

6. Bibliografía.

Abete, I., Goyenechea, E., Zulet, M. A., & Martínez, J. A. (2011). Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 21, B1-B15.

Altuner, E. M., Alpas, H., Erdem, Y. K., & Bozoglu, F. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical and biochemical properties of milk. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 392-396.

Arslanoglu, S., Bertino, E., Tonetto, P., De Nisi, G., Ambruzzi, A. M., Biasini, A., ... & Moro, G. E. (2010). Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank: Italian Association of Human Milk Banks Associazione Italiana Banche del Latte Umano Donato (AIBLUD: www.aiblud.org). *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 23(sup2), 1-20.

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food research international*, 48(2), 410-427.

Ball, C. O. (1943). Short-time pasteurization of milk. *Industrial & Engineering Chemistry*, 35(1), 71-84.

Benedito, J., Ortuño, C., Castillo-Zamudio, R. I., & Mulet, A. (2015). Microbial inactivation by ultrasound assisted supercritical fluids. *Physics Procedia*, 70, 824-827.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Study of butter fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(2), 176-185.

Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M. G., Mawson, R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 172-178.

Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Composition properties, physicochemical characteristics and shelf life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. *Journal of Food Quality*, 32(3), 283-302.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Power ultrasound to process dairy products. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 445-465). Springer, New York, NY.

Bermúdez-Aguirre, D., Fernández, S., Esquivel, H., Dunne, P. C., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Milk processed by pulsed electric fields: Evaluation of microbial quality, physicochemical characteristics, and selected nutrients at different storage conditions. *Journal of food science*, 76(5), S289-S299.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 383-392.

Bertino, E., Coppa, G. V., Giuliani, F., Coscia, A., Gabrielli, O., Sabatino, G., ... & Fabris, C. (2008). Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 21(2), 381-385.

Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of food engineering*, 67(1-2), 21-33.

Bryan, F. L. (1983). Epidemiology of milk-borne diseases. *Journal of food protection*, 46(7), 637-649.

Buckow, R., Chandry, P. S., Ng, S. Y., McAuley, C. M., & Swanson, B. G. (2014). Opportunities and challenges in pulsed electric field processing of dairy products. *International Dairy Journal*, 34(2), 199-212.

Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., & Nicoli, M. C. (2004). Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*, 14(5), 421-427.

Calvo, M. M., & de la Hoz, L. (1992). Flavour of heated milks. A review. *International Dairy Journal*, 2(2), 69-81.

Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science & Technology*, 89(1), 83-98.

Clement, C. D. (2018). Effect of Heat Treatment on Camel Milk Proteins.

Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D. (2008). High-pressure processing—effects on microbial food safety and food quality. *FEMS microbiology letters*, 281(1), 1-9.

Contador, R., Delgado, F. J., García-Parra, J., Garrido, M., & Ramírez, R. (2015). Volatile profile of breast milk subjected to high-pressure processing or thermal treatment. *Food chemistry*, *180*, 17-24.

Coutinho, H. B., Da Mota, H. C., Coutinho, V. B., Robalinho, T. I., Furtado, A. F., Walker, E., ... & Wakelin, D. (1998). Absence of lysozyme (muramidase) in the intestinal Paneth cells of newborn infants with necrotising enterocolitis. *Journal of Clinical Pathology*, *51*(7), 512-514.

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 Protection*, *69*(3), 556-563.

Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., & Navarro, M. P. (2006). Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: in vitro and in vivo assays. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(2), 271-278.

Delgado, J. O. (2012). Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos. *Publicaciones e Investigación*, *6*, 141-152.

Delgado, F. J., Contador, R., Álvarez-Barrientos, A., Cava, R., Delgado-Adámez, J., & Ramírez, R. (2013). Effect of high pressure thermal processing on some essential nutrients and immunological components present in breast milk. *Innovative food science & emerging technologies*, *19*, 50-56.

Delgado, F. J., Cava, R., Delgado, J., & Ramírez, R. (2014). Tocopherols, fatty acids and cytokines content of holder pasteurised and high-pressure processed human milk. *Dairy Science & Technology*, *94*(2), 145-156.

Díaz, J., Ivorra, A., Muelas, R., Romero, G., Sanchez, A., Peris, C., & Fernández, N. (2014). Estudio de la conductividad eléctrica en leche de cabra de raza murciano-granadina en condiciones fisiológicas. *La sociedad española de ovinotecnia y caprinotecnia*, 561.

Di Giacomo, G., Taglieri, L., & Carozza, P. (2009, May). Pasteurization and sterilization of milk by supercritical carbon dioxide treatment. In Proceedings of the 9th International Symposium on Supercritical Fluids (pp. 18-20).

Doran, P., Carson, J., Costello, E., & More, S. J. (2009). An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on an Irish dairy farm, following the consumption of raw milk. *Irish veterinary journal*, *62*(6), 390.

Dutreux, N., Notermans, S., Wijtzes, T., Gongora-Nieto, M. M., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. (2000). Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *54*(1-2), 91-98.

Earnshaw, R. G., Appleyard, J., & Hurst, R. M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International journal of food microbiology*, 28(2), 197-219.

Elagamy, E. I. (2000). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 68(2), 227-232.

Elliott, A. J., Datta, N., Amenu, B., & Deeth, H. C. (2005). Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *Journal of Dairy Research*, 72(4), 442-446.

Erkmen, O. (2012). Effects of dense phase carbon dioxide on vegetative cells. *Dense phase carbon dioxide: food and pharmaceutical applications*, 67-97.

Ewaschuk, J. B., Unger, S., Harvey, S., O'Connor, D. L., & Field, C. J. (2011). Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(2), 175-182.

Felipe, X., Capellas, M., & Law, A. J. (1997). Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 627-631.

Fernández Fernández, E., Martínez Hernández, J. A., Martínez Suárez, V., Moreno Villares, J. M., Collado Yurrita, L. R., Hernández Cabria, M., & Morán Rey, F. J. (2015). Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 92-101.

Floury, J., Grosset, N., Leconte, N., Pasco, M., Madec, M. N., & Jeantet, R. (2006). Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Le Lait*, 86(1), 43-57.

García Lara, N. R. (2015). *Cambio en la composición de la leche materna secundario a la conservación en frío, pasteurización y administración* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Gervilla, R., Ferragut, V., & Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 674-682.

Giuseppina, C., Tony, F. V., Bijo, B., Fatmira, S., & Giuseppina, T. (2006). Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in milk using polymerase chain reaction (PCR). *Food control*, 17(10), 776-780.

Gómez, R. S., Salgado, M. D., Miras, E. B., de Andrés González, A., & Arnáez, F. Z. (2007). Oxidative stress in the newborn and its influence on pulmonary vascular physiology. *Acta Pediátrica Española*, 65(2), 67.

Gomez-Gomez, A., Brito-de la Fuente, E., Gallegos, C., Garcia-Perez, J. V., & Benedito, J. (2020). Non-thermal pasteurization of lipid emulsions by combined supercritical carbon dioxide and high-power ultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 105138.

González Márquez, M. J. (2007). Diseño de un pasteurizador para helados.

Gunter-Ward, D. M., Patras, A., S. Bhullar, M., Kilonzo-Nthenge, A., Pokharel, B., & Sasges, M. (2018). Efficacy of ultraviolet (UV-C) light in reducing foodborne pathogens and model viruses in skim milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13485.

Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Lelas, V., & Mededovic Thagard, S. (2012). The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 46-52.

Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A., & Knorr, D. (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields—basic concepts for process design. *Trends in food science & technology*, 12(3-4), 103-111.

Huang, K., & Wang, J. (2009). Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering*, 95(2), 227-239.

Jay-Russell, M. T. (2010). Raw (unpasteurized) milk: are health-conscious consumers making an unhealthy choice?. *Clinical infectious diseases*, 51(12), 1418-1419.

Kermack, W. O., & Miller, R. A. (1951). The Electrical Conductivity and Chloride Content of Women's Milk: Part I: Methods and Practical Application. *Archives of disease in childhood*, 26(127), 265.

Kilshaw, P. J., Heppell, L. M., & Ford, J. E. (1982). Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Archives of Disease in Childhood*, 57(11), 842-847.

Koenig, Á., Diniz, E. M. D. A., Barbosa, S. F. C., & Vaz, F. A. C. (2005). Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation*, 21(4), 439-443.

Koletzko, B., Agostoni, C., Bergmann, R., Ritzenthaler, K., & Shamir, R. (2011). Physiological aspects of human milk lipids and implications for infant feeding: a workshop report. *Acta paediatrica*, 100(11), 1405-1415.

Latorre, A. A., Pradhan, A. K., Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Boor, K. J., Rice, D. H., ... & Schukken, Y. H. (2011). Quantitative risk assessment of listeriosis due to consumption of raw milk. *Journal of food protection*, 74(8), 1268-1281.

Ley, S. H., Hanley, A. J., Stone, D., & O'Connor, D. L. (2011). Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatric research*, 70(3), 278-281.

López-Malo, A., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. *Journal of food protection*, 62(10), 1215-1217.

Lucey, J. A. (2015). Raw milk consumption: risks and benefits. *Nutrition today*, 50(4), 189.

Manas, P., & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of applied microbiology*, 98(6), 1387-1399.

Martinez, F. E., Davidson, A. G. F., Anderson, J. D., Nakai, S., Desai, I. D., & Radcliffe, A. (1992). Effects of ultrasonic homogenization of human milk on lipolysis, IgA, IgG, lactoferrin and bacterial content. *Nutrition Research*, 12(4-5), 561-568.

Martin, O., Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20(4), 317-336.

Matak, K. E., Churey, J. J., Worobo, R. W., Sumner, S. S., Hovingh, E., Hackney, C. R., & Pierson, M. D. (2005). Efficacy of UV light for the reduction of *Listeria monocytogenes* in goat's milk. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2212-2216.

Mendes-Oliveira, G., Jin, T. Z., & Campanella, O. H. (2020). Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* in juices by pulsed electric fields: The role of the energy density. *Journal of Food Engineering*, 110001.

Michalac, S., Alvarez, V. T. J. I., Ji, T., & Zhang, Q. H. (2003). Inactivation of selected microorganisms and properties of pulsed electric field processed milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(2), 137-151.

Miller, G. D., DiRienzo, D. D., Reusser, M. E., & McCarron, D. A. (2000). Benefits of dairy product consumption on blood pressure in humans: a summary of the biomedical literature. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup2), 147S-164S.

Min, S., Reina, L., & Zhang, Q. H. (2002). Water activity and the inactivation of *Enterobacter cloacae* inoculated in chocolate liquor and a model system by pulsed electric field treatment. *Journal of food processing and preservation*, 26(5), 323-337.

Morales, F. J., Romero, C., & Jiménez-Pérez, S. (2000). Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International journal of food science & technology*, 35(2), 193-200.

ODISHA UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY (Dept. of Agricultural Processing and Food Engineering)., s.f. Chapter 6: Sterilization. Recuperado

9 de junio de 2020, de http://ouat.nic.in/sites/default/files/6-sterilisation_of_milk_dairy_and_food_engineering.pdf

Odriozola-Serrano, I., Bendicho-Porta, S., & Martín-Belloso, O. (2006). Comparative study on shelf life of whole milk processed by high-intensity pulsed electric field or heat treatment. *Journal of dairy science*, 89(3), 905-911.

Ordoñez, J. A., Aguilera, M. A., Garcia, M. L., & Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research*, 54(1), 61-67.

Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., & Benedito, J. (2012). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15, 31-37.

Ortuño, C., Balaban, M., & Benedito, J. (2014). Modelling of the inactivation kinetics of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and pectin methylesterase in orange juice treated with ultrasonic-assisted supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 90, 18-26.

Ortuño Cases, C. (2014). *Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos* (Doctoral dissertation).

Oulé, M. K., Tano, K., Bernier, A. M., & Arul, J. (2006). *Escherichia coli* inactivation mechanism by pressurized CO₂. *Canadian journal of microbiology*, 52(12), 1208-1217.

Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M. A., & Benedito, J. (2016). Ultrasound-assisted supercritical CO₂ treatment in continuous regime: Application in *Saccharomyces cerevisiae* inactivation. *Journal of food engineering*, 181, 42-49.

Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M. A., & Benedito, J. (2018). Orange juice processing using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO₂ system: Microbiota inactivation and product quality. *Innovative food science & emerging technologies*, 47, 362-370.

Pasteurizar para garantizar la seguridad alimentaria. (2018, octubre 15). Recuperado 10 de mayo de 2020, de <https://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/227016-Pasteurizar-para-garantizar-la-seguridad-alimentaria.html>

Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(2), 147-154.

Patton, S. (1958). Heat Effects on Milk, Review of Organic Chemical Effects of Heat on Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(2), 132-135.

Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., ... & Coscia, A. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients*, 8(8), 477.

Peila, C., Emmerik, N. E., Giribaldi, M., Stahl, B., Ruitenbergh, J. E., Van Elburg, R. M., ... & Cavallarin, L. (2017). Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(3), 353-361.

Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International journal of food microbiology*, 87(3), 207-216.

Preguntas frecuentes sobre lactancia materna | Asociación Española de Pediatría. Recuperado 10 de abril de 2020, de <https://www.aeped.es/comite-nutricion-y-lactancia-materna/lactancia-materna/preguntas-frecuentes-sobre-lactancia-materna#t48n159>

Qin, B. L., Pothakamury, U. R., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., & Peleg, M. (1996). Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(6), 603-627.

Reina, L. D., Jin, Z. T., Zhang, Q. H., & Yousef, A. E. (1998). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of food protection*, 61(9), 1203-1206.

Raikos, V. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 259-265.

Raso, J., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Non-thermal processing | Pulsed electric field.

Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques.

Raso-Pueyo, J., & Heinz, V. (Eds.). (2010). *Pulsed electric fields technology for the food industry: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media.

Raventós, M., Duarte, S., & Alarcón, R. (2002). Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. *Food Science and Technology International*, 8(5), 269-284.

Raviyan, P., Zhang, Z., & Feng, H. (2005). Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of food engineering*, 70(2), 189-196.

Reginensi, S., González, M. J., Olivera, J. A., Infante, I., Juliano, P., & Bermúdez, J. (2015). Microorganismos termotóxicos en la leche causantes de defectos en la producción quesera. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 23(5).

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., & Muža, M. (2009). Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo: časopis za unaprijeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 59(4), 267-281.

Rossato, N. (2008). Lactancia materna e inmunidad: Nuevos aspectos. *Archivos argentinos de pediatría*, 106(5), 385-386.

Rozenberg, S., Body, J. J., Bruyere, O., Bergmann, P., Brandi, M. L., Cooper, C., ... & Rizzoli, R. (2016). Effects of dairy products consumption on health: benefits and beliefs—a commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcified tissue international*, 98(1), 1-17.

Sampedro Parra, F. (2008). Impacto del tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad y altas presiones hidrostáticas sobre la calidad y seguridad microbiológica de un alimento mezcla de zumo de naranja y leche (Doctoral dissertation).

Sampedro, F., & Rodrigo, D. (2015). Pulsed electric fields (PEF) processing of milk and dairy products. *Emerging Dairy Processing Technologies*, 1, 115-148.

Sanchez-Moreno, C., De Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martinez, P., & Cano, M. P. (2009). Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(6), 552-576.

Sakkas, L., Moutafi, A., Moschopoulou, E., & Moatsou, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food chemistry*, 159, 293-301.

Seguridad microbiológica de los alimentos - Ordenación Farmacéutica - Transmisiones - Farmacia - Gobierno Vasco - Euskadi.eus. (s. f.). Recuperado 13 de mayo de 2020, de <https://www.euskadi.eus/informacion/seguridad-microbiologica-de-los-alimentos/web01-a3contal/es/>

Seiquer, I., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Navarro, M. P. (2010). Assessing the effects of severe heat treatment of milk on calcium bioavailability: in vitro and in vivo studies. *Journal of dairy science*, 93(12), 5635-5643.

Sepulveda, D. R., Góngora-Nieto, M. M., Guerrero, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Shelf life of whole milk processed by pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 735-739.

Silvestre, D., Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareño, E., & Romero, F. J. (2008). Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatrica*, 97(8), 1070-1074.

Soares, D., Lerin, L. A., Cansian, R. L., Oliveira, J. V., & Mazutti, M. A. (2013). Inactivation of *Listeria monocytogenes* using supercritical carbon dioxide in a high-pressure variable-volume reactor. *Food control*, *31*(2), 514-518.

Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(11-12), 544-556.

Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F. M., & Bertoloni, G. (2003). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *4*(2), 161-165.

Spilimbergo, S., Mantoan, D., & Dalser, A. (2007). Supercritical gases pasteurization of apple juice. *The Journal of supercritical fluids*, *40*(3), 485-489.

Qin, B. L., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., Pedrow, P. D., & Olsen, R. G. (1998). Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE Transactions on Industry Applications*, *34*(1), 43-50.

Ulloa, J. A., Ulloa, P. R., Ramírez, J. C. R., & Rangel, B. E. U. (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Revista: Nueva Época. Nayarit. México*.

Van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, *62*(4), 403-414.

Vandevenne, C. A. (2002). *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.

Viazis, S., Farkas, B. E., & Jaykus, L. A. (2008). Inactivation of bacterial pathogens in human milk by high-pressure processing. *Journal of food protection*, *71*(1), 109-118.

Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of food engineering*, *45*(3), 171-179.

Villamiel, M., López-Fandiño, R., Corzo, N., & Olano, A. (1997). Denaturation of β -lactoglobulin and native enzymes in the plate exchanger and holding tube section during continuous flow pasteurization of milk. *Food chemistry*, *58*(1-2), 49-52.

Watts, S. (2016). A mini review on technique of milk pasteurization. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *5*(5), 99.

Werner, B. G., & Hotchkiss, J. H. (2006). Continuous flow nonthermal CO₂ processing: the lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacterial spores in raw milk. *Journal of dairy science*, *89*(3), 872-881.

Wood, R. C., MacDonald, K. L., & Osterholm, M. T. (1992). Campylobacter enteritis outbreaks associated with drinking raw milk during youth activities: a 10-year review of outbreaks in the United States. *Jama*, 268(22), 3228-3230.

Yu, L. J., Ngadi, M., & Raghavan, G. S. V. (2009). Effect of temperature and pulsed electric field treatment on rennet coagulation properties of milk. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 115-118.