

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE FILTRACIÓN A TRAVÉS DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON COMPUESTOS BIOACTIVOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LACTOSUERO

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: Alejandra Sarahí Mejía Díaz

TUTORA ACADEMICO: Isabel Fernández-Segovia
Jose M. Barat Baviera

TUTORA EXTERNA: María Ruiz-Rico
Nataly Peña-Gómez

Curso Académico: 2018/2019

VALENCIA, septiembre 2019

APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE FILTRACIÓN A TRAVÉS DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON COMPUESTOS BIOACTIVOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LACTOSUERO

Alejandra S. Mejía, Nataly Peña-Gómez, María Ruiz-Rico, Isabel Fernández-Segovia, José M. Barat¹

Resumen: El objetivo de este trabajo fue aplicar un sistema de filtración basado en micropartículas de sílice funcionalizadas con ácido ferúlico y eugenol para reducir la carga microbiana del suero de leche. Se estudiaron dos tamaños de partícula de sílice que fueron funcionalizadas con los compuestos bioactivos, empleándose también partículas sin funcionalizar (controles). Las muestras de lactosuero fueron filtradas a través de las diferentes partículas (funcionalizadas y control) y se evaluó la influencia del tamaño de partícula y del tipo de compuesto activo sobre parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, sólidos solubles, color y contenido en proteínas) y recuentos microbiológicos (microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras) del lactosuero. Los resultados mostraron la capacidad de las micropartículas funcionalizadas para inhibir la microbiota típica del lactosuero. El ácido ferúlico inmovilizado mostró mayor eficacia antimicrobiana, especialmente empleando partículas de sílice de 200 μm , aunque afectó a algunos parámetros fisicoquímicos, como el color y el pH. Las partículas desnudas y funcionalizadas con eugenol afectaron el contenido de proteína. Sin embargo, la inmovilización de compuestos bioactivos sobre la superficie de micropartículas de sílice presenta un alto potencial como una tecnología alternativa no térmica, obteniendo una reducción microbiana que permite la conservación del lactosuero fresco.

Palabras clave: Lactosuero, eugenol, ácido ferúlico, filtración, reducción microbiana.

Resum: L'objectiu d'aquest treball va ser aplicar un sistema de filtració basat en micropartícules de sílice funcionalitzades amb àcid ferúlic i eugenol per a reduir la càrrega microbiana del sèrum de llet. Es van estudiar dues grandàries de partícula de sílice que van ser funcionalitzades amb els compostos bioactius, emprant-se també partícules sense funcionalitzar (controls). Les mostres de lactosèrum van ser filtrades a través de les diferents partícules (funcionalitzades i control) i es va avaluar la influència de la grandària de partícula i del tipus de compost actiu sobre paràmetres fisicoquímics (pH, acidesa, sòlids solubles, color i contingut en proteïnes) i recomptes microbiològics (microorganismes aerobis mesòfils, psicròfils i floridures i llevats) del lactosèrum. Els resultats van mostrar la capacitat de les micropartícules funcionalitzades per a inhibir la microbiota típica del lactosèrum. L'àcid ferúlic immobilitzat va mostrar major eficàcia antimicrobiana, especialment emprant partícules de sílice de 200 μm , encara que va afectar alguns paràmetres fisicoquímics, com el color i el pH. Les partícules nues i funcionalitzades amb eugenol van afectar el contingut de proteïna. No

¹ Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, España

obstant això, la immobilització de compostos bioactius sobre la superfície de micropartícules de sílice presenta un alt potencial com una tecnologia alternativa no tèrmica, obtenint una reducció microbiana que permet la conservació del lactosèrum fresc.

Paraules clau: Lactosèrum, eugenol, àcid ferúlic, filtració, reducció microbiana.

Abstract: The objective of this work was to apply a filtration system based on silica microparticles functionalized with ferulic acid and eugenol to reduce the microbial load of whey. Two sizes of silica particles that were functionalized with the bioactive compounds were studied, also using non-functionalized particles (controls). The whey samples were filtered through the different particles (functionalized and control) and the influence of the particle size and the type of active compound on physicochemical parameters (pH, acidity, soluble solids, color and protein content) and microbiological counts (aerobic mesophilic microorganisms, psychrophiles and molds and yeasts) of the whey was evaluated. The results showed the ability of functionalized microparticles to inhibit the typical microbiota of the whey. Immobilized ferulic acid showed greater antimicrobial efficacy, especially using 200 µm silica particles, although it affected some physicochemical parameters, such as color and pH. The naked and functionalized particles with eugenol affected the protein content. However, the immobilization of bioactive compounds on the surface of silica microparticles has a high potential as an alternative non-thermal technology, obtaining a microbial reduction that allows the conservation of fresh whey.

Keywords: Whey, eugenol, ferulic acid, filtration, microbial reduction.

1. INTRODUCCIÓN

El lactosuero es un subproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína en el proceso de elaboración de quesos. La composición del lactosuero varía dependiendo del tipo de leche, queso elaborado y el proceso empleado. Aunque a menudo es considerado un residuo, el suero tiene un alto valor para la industria alimentaria, ya que es muy rico en proteínas que contienen aminoácidos esenciales y azúcares (Buhler et al., 2019; Wen-Qiong et al., 2019). Las proteínas aportan diferentes propiedades organolépticas (realzando el sabor y el color) y funcionales (como gelificante, espumante, emulsificante y estabilizante) que hacen que el suero tenga un alto interés en la formulación de alimentos (Parra, 2009; Playne et al., 2003). El lactosuero es usado en la formulación de alimentos infantiles o en alimentos dietéticos y saludables (De Wit, 1998); además se emplea en la fabricación de piensos para alimentación animal (Bacenetti et al., 2018).

En el lactosuero pueden encontrarse patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* o *Escherichia coli* entre otros (Buhler et al., 2019; Ramos et al., 2015).

Para garantizar la estabilidad microbiológica del lactosuero generalmente se utilizan tratamientos térmicos; sin embargo, éstos suelen tener un impacto negativo en la calidad del producto, ya que las altas temperaturas pueden afectar a las propiedades funcionales del mismo, así como causar pérdidas nutricionales, debido a procesos de desnaturalización de proteínas y a las reacciones de Maillard. Por ello, se han estudiado alternativas a los tratamientos térmicos, como la irradiación UV, la cual ha demostrado la misma capacidad de reducción logarítmica de enterobacterias que el tratamiento térmico y una mayor reducción de aerobios mesófilos en muestras de suero desnatado (Buhler et al., 2019). Sin embargo, la eficacia de la irradiación UV se reduce por la opacidad, la turbidez y la presencia de partículas en alimentos líquidos, además causa cambios en la estructura terciaria de las proteínas, formación de productos de oxidación, susceptibilidad a proteólisis, entre otros (Huppertz et al., 2019). Por su parte, la tecnología de altas presiones hidrostáticas ha evidenciado que en presencia de un co-soluto (lactosa), la proteína resiste la desnaturalización fisicoquímica que resulta en la preservación de la conformación nativa de estructuras secundarias y terciarias (Dissanayake et al., 2013), siendo eficiente en la inactivación de bacterias patógenas y de descomposición comunes en el suero (Ramos et al., 2015). Otras tecnologías como los pulsos eléctricos han demostrado la posibilidad de la inactivación selectiva de células de levadura (Simonis et al., 2019). No obstante, se debe tener en cuenta los altos costes del proceso (Palou et al., 2004).

Además de los sistemas de conservación descritos, la filtración por membrana ha jugado un papel importante en la industria del lactosuero, al ser un sistema eficiente y asequible de eliminación de microorganismos y residuos sólidos usado principalmente para la concentración de suero con pérdidas mínimas (Huma et al., 2015). Sin embargo, presenta limitaciones como el bloqueo de los poros por la formación de la torta de proteína. La

principal proteína del suero, la β -lactoglobulina induce el ensuciamiento de la membrana, en donde pueden encontrarse restos de lactosa y ceniza después de varias etapas de filtración, incrementando los costes de producción en materiales y el consumo de agua (Wen-Qiong et al., 2019).

Con el objetivo de mejorar la eficacia y vida útil de los sistemas de filtración, recientemente se han desarrollado soportes con superficies modificadas para mejorar la permeabilidad de los materiales filtrantes, incrementar la capacidad de reducción de carga microbiana y favorecer la regeneración de los soportes (Mohammad et al., 2015).

La inmovilización de compuestos bioactivos ha sido propuesta en los últimos años como una solución eficaz para prevenir las limitaciones de los sistemas de filtración actuales. Entre los compuestos bioactivos que pueden ser fijados a la superficie de los soportes de filtración destacan los antimicrobianos naturales. Las plantas generan como estrategia de protección, metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas que les permiten defenderse de los ataques microbianos. Los aceites esenciales y los extractos acuosos de plantas contienen compuestos fenólicos con reconocida actividad antimicrobiana y antioxidante (Borges et al., 2013; Burt, 2004).

Entre los compuestos fenólicos, cabe destacar el ácido ferúlico y eugenol, compuestos que forman parte tanto de los extractos hidrófilos como hidrófobos de diversas plantas y que han sido identificados como compuestos antimicrobianos y antioxidantes (Pernin et al., 2019a). El problema que presenta el eugenol para su uso como conservante natural en alimentos es que no es soluble en agua, dificultando su aplicación en las matrices alimentarias (Hu et al., 2018). Además, es altamente volátil y presenta fuertes propiedades organolépticas (sabor y olor) que limitan su aplicación en la industria alimentaria (Burt, 2004). El ácido ferúlico es insoluble en agua a temperatura ambiente (Kumar y Pruthi, 2014), presenta un modo de acción multifactorial, posee una función ácida y no es excesivamente hidrófobo (Pernin et al., 2019a). Este compuesto ha demostrado una gran capacidad antimicrobiana en cepas como *S. aureus* y *Bacillus cereus*, así como en *L. monocytogenes* (Takahashi et al., 2013; Takahashi et al., 2015a; Takahashi et al., 2015b; Pernin et al., 2019a; Pernin et al., 2019b).

Con el objetivo de limitar los problemas asociados con el uso de estos antimicrobianos naturales en su forma libre en los alimentos, recientemente se ha desarrollado un método de inmovilización covalente de ciertos componentes de aceites esenciales sobre partículas de sílice, obteniendo partículas funcionalizadas con propiedades antimicrobianas mejoradas tanto *in vitro* como en distintas matrices alimentarias (Ribes et al., 2019; Ruiz-Rico et al., 2017). En un estudio se emplearon partículas de sílice funcionalizadas con eugenol como materiales filtrantes para el tratamiento de zumo de manzana, dando como resultado la reducción de 5 órdenes logarítmicos de *E. coli*, además de eliminar completamente la carga microbiana del producto fresco, sin afectar a los parámetros fisicoquímicos y organolépticos. Por lo tanto, esta tecnología tiene un alto potencial como sistema de pasteurización en frío para alimentos líquidos (Peña-Gómez et al., 2019).

Estos dos últimos estudios son los que han dado impulso y base al trabajo expuesto a continuación, cuyo objetivo fue aplicar un sistema de filtración

basado en partículas de sílice funcionalizadas con eugenol o ácido ferúlico para reducir la carga microbiana del lactosuero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar el efecto de la filtración de lactosuero a través de partículas de sílice funcionalizadas, se ensayaron dos soportes con distinto tamaño de partícula (375 o 200 μm), los cuales fueron funcionalizados con dos compuestos antimicrobianos (eugenol o ácido ferúlico) y se evaluaron distintos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

2.1. Materiales y reactivos

Los compuestos 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), cloroformo, *n*-butanona, eugenol, ácido ferúlico, *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y las micropartículas de óxido de silicio (200 y 375 μm) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El acetonitrilo, etanol, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, hidróxido sódico, fenolftaleína, ácido bórico y medios de cultivo para los ensayos microbiológicos fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España).

2.2. Preparación de las partículas de sílice funcionalizadas

2.2.1. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE

La preparación de los soportes antimicrobianos se basó en la inmovilización covalente de eugenol y ácido ferúlico sobre la superficie de micropartículas de sílice comerciales de tamaño de partícula de 375 o 200 μm . El proceso para funcionalizar las partículas de sílice con eugenol consistió en transformar este compuesto en un derivado aldehído, mediante una reacción de Reimer-Tiemann. Una vez obtenido el derivado aldehído, se hizo reaccionar con APTES para formar el derivado alcoxisilano, que a continuación, se hizo reaccionar con las partículas de sílice con la finalidad de inmovilizar covalentemente el eugenol sobre la superficie de las partículas de sílice amorfa (Ruiz-Rico, 2017).

Para la funcionalización de las partículas de sílice con el ácido ferúlico, se adaptó el método de Zhao et al. (2009), que consta de dos etapas: 1) el derivado de alcoxisilano de la sílice se obtuvo mezclando una proporción de 10 g de sílice y 10 g de APTES en 100 mL de acetonitrilo, que fue mantenido en agitación durante 5 h. Posteriormente se realizó un lavado con acetonitrilo y se centrifugó (5804 R, Eppendorf, Alemania) durante 8 min a 10000 rpm, para obtener la sílice-3-aminopropilo funcionalizada. 2) En esta segunda etapa, el ácido ferúlico se unió al puente de alcoxisilano presente en la sílice del paso anterior. Para ello, 5,5 g de sílice funcionalizada se mezclaron con 100 mL de acetonitrilo. En paralelo, se mezclaron 3 g de ácido ferúlico, 2 g de NHS y 4 g de EDC en 50 mL de acetonitrilo y se agitaron durante 15 min. Una

vez homogéneas, las dos diluciones previas, se mezclaron y se dejaron en agitación durante 24 h a temperatura ambiente.

Finalmente, los sólidos funcionalizados con eugenol y ácido ferúlico resultantes, se lavaron con acetonitrilo y agua destilada y se centrifugaron a 8000 rpm durante 8 min, y se secaron durante 12 h a temperatura ambiente.

En total se obtuvieron 6 tipos diferentes de partículas de sílice, 4 de ellas funcionalizadas y dos sin funcionalizar: partículas de 200 μm funcionalizadas con eugenol (E200), partículas de 375 μm funcionalizadas con eugenol (E375), partículas de 200 μm funcionalizadas con ácido ferúlico (F200), partículas de 375 μm funcionalizadas con ácido ferúlico (F375), partículas de 200 μm sin funcionalizar (C200) y partículas de 375 μm sin funcionalizar (C375).

2.2.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ZETA DE LOS SOPORTES DE SÍLICE

Una vez funcionalizados los soportes de sílice, se llevó a cabo un estudio de la carga superficial mediante la determinación del potencial zeta, con el fin de confirmar la correcta inmovilización del eugenol y del ácido ferúlico. Para medir el potencial zeta de los soportes sin funcionalizar y funcionalizados, se utilizó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Los sólidos se dispersaron en agua destilada, aplicando ultrasonidos durante 3 min para evitar la agregación de las partículas. El potencial zeta fue calculado a partir de los valores de movilidad de las partículas usando el modelo de Smoluchowski. La obtención del valor de potencial zeta se estimó a partir de 3 repeticiones.

2.3. Preparación del lactosuero

La preparación del lactosuero se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hayes y Nielsen (2000). Se partió de muestras de leche fresca entera Hacendado adquiridas en un supermercado local de Valencia. Se tomaron 1000 mL de leche que fueron desgrasados por separación de fases mediante centrifugación durante 25 min a 4000g y 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una precipitación ácida para separar las fracciones de lactosuero y caseína. Para ello, la leche desgrasada se acidificó a 21 °C a pH 4,6 (GpH73, EUTECH, Instruments, Países Bajos), utilizando aproximadamente 4 mL de HCl concentrado. A continuación, se separó la fracción de lactosuero bajo las mismas condiciones de centrifugación, colocando el lactosuero obtenido en botellas estériles de 500 mL. Todas las muestras de suero fueron almacenadas a 4 °C durante 12-16 h hasta su procesado y análisis posteriores.

2.4. Evaluación de la capacidad de retención microbiana de los soportes funcionalizados

Se evaluó la capacidad de retención microbiana del sistema de filtración desarrollado con los compuestos bioactivos inmovilizados, sobre la microflora endógena del lactosuero.

El sistema de filtración utilizado consistió en una rampa de filtración (sistema de filtración Microfil®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), conectada a una bomba de vacío, sobre la cual se situaba un papel de celulosa en la base, un embudo y el lecho de las partículas de sílice funcionalizadas o sin funcionalizar (4 ± 1 g de partículas, para obtener un espesor de lecho de 0,5 cm). Todos los materiales utilizados y accesorios del montaje de filtración fueron previamente esterilizados. Los ensayos de filtración se llevaron a cabo por triplicado.

El proceso de filtración se llevó a cabo con 100 mL de lactosuero que fueron filtrados a través del lecho de partículas de los diferentes soportes funcionalizados (E200, E375, F200, F375) y sin funcionalizar o controles (C200, C375). Tras su paso por el sistema de filtración, el lactosuero se recogió en matraces estériles para los posteriores análisis.

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo por duplicado para determinar el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras. Para ello, se tomó una alícuota de la muestra, se prepararon diluciones decimales seriadas y se llevó a cabo la siembra en placa. Para la enumeración de microorganismos mesófilos se realizó la siembra en profundidad de 1 mL de muestra en PCA (Plate Count Agar) y se incubaron las placas a 30 °C durante 72 h. Para evaluar el crecimiento de microorganismos psicrófilos se llevó a cabo la siembra en profundidad de 1 mL de muestra en PCA e incubación a 4 °C durante 10 días. Para la enumeración de mohos y levaduras se realizó la siembra del lactosuero en superficie de 0,1 mL de muestra en el medio PDA (Potato Dextrose Agar) y las placas fueron incubadas a 25 °C durante 72 h.

2.5. Influencia del proceso de filtración sobre los parámetros fisicoquímicos del lactosuero

Con el fin de estudiar la influencia del tratamiento sobre los parámetros fisicoquímicos, se realizó un seguimiento del suero sin filtrar y filtrado a través de los diferentes soportes. Los parámetros que se determinaron fueron: contenido de proteínas, sólidos solubles, acidez, pH y color.

Para la determinación de proteínas se siguió el método Kjeldahl 928.08 descrito por la AOAC (2000). Se pesaron 3 g de muestra en un tubo de mineralización y 3 g de catalizador (sales de cobre, óxido de titanio y óxido de selenio) junto con 5 mL de H₂O₂ y 10 mL de H₂SO₄ concentrado. Posteriormente las muestras fueron sometidas a una digestión a 420 °C en un digestor automático JP-Selecta Bloc Digest 6 (JP. Selecta S.A., Barcelona, España) hasta que la disolución adquiría un color verde esmeralda característico. Una vez frío el tubo de mineralización, se adicionaron 50 mL de agua destilada junto con una cantidad en exceso de NaOH 10 N (50 mL) para alcalinizar el medio. Finalmente se llevó a cabo la destilación en un destilador automático JP-Selecta Pro-Nitro (JP. Selecta S.A., Barcelona, España) y así desplazar el amoniaco de las sales amónicas. El amoniaco liberado fue recogido sobre 50 mL de una disolución valorada de ácido bórico al 4 % (p/v). La última etapa fue la valoración realizada por medio de una volumetría ácido-base, empleando H₂SO₄ 0,03 N y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno (indicador mixto Shiro T-

Shiro). El factor de conversión empleado para obtener la tasa de proteína bruta a partir del nitrógeno total fue de 6,38.

Para la determinación de los sólidos solubles se utilizó un refractómetro (RFM300, Bellingham & Stanley Ltd, Kent, Reino Unido), donde se leían los °Brix directamente en la escala del refractómetro. Tras el calibrado del refractómetro con agua destilada, se depositó una pequeña cantidad de la muestra en el prisma con una pipeta Pasteur, y se procedió a realizar la medida.

La determinación de la acidez del lactosuero se llevó a cabo mediante una valoración ácido-base con NaOH 0,1 N, previamente titulada, usando fenolftaleína como indicador. En un matraz Erlenmeyer se introdujeron 10 mL del lactosuero junto con 40 mL de agua destilada y 3 gotas del indicador. Se valoró con NaOH hasta un viraje de incoloro a color rosado. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de ácido láctico.

La determinación del pH se realizó con un pH-metro portátil.

Para la determinación del color se usó un fotocolorímetro (CM-700d/600d, Konica Minolta, Japón), observador 10° e iluminante D65. A partir de las coordenadas colorimétricas del sistema CIEL*a*b* (1976), L* (luminosidad), a* (desviación hacia el rojo y el verde) y b* (desviación hacia el amarillo y el azul). A su vez, se calcularon mediante la Ecuación 1 los valores correspondientes a las diferencias de color global (ΔE) producidas, respecto al lactosuero sin filtrar y los controles.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (1)$$

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

2.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA). Con el objetivo de comprobar el efecto de la filtración a través de los soportes funcionalizados, así como el tamaño de partícula, sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del lactosuero se llevó a cabo un análisis de la varianza multifactor (ANOVA multifactorial). El procedimiento LSD (least significant difference) se usó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

Por otra parte, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con todos los parámetros estudiados (10 variables) para evaluar la variabilidad global existente entre las diferentes partículas empleadas en el sistema de filtración. El programa estadístico empleado para realizar el PCA fue XLSTAT (Long Island, NY, USA) (Addinsoft, 2019).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de los soportes funcionalizados con eugenol y ácido ferúlico

Para comprobar la correcta inmovilización de los componentes sobre la superficie de las partículas, se llevó a cabo un estudio de potencial zeta. La Tabla 1 muestra los valores de potencial zeta de las partículas desnudas (control) y funcionalizadas suspendidas en agua destilada. La carga superficial de la sílice control mostró valores de potencial negativos, debido a la presencia de grupos silanoles en la superficie. Los soportes de sílice funcionalizados mostraron valores positivos debido al anclaje de cada compuesto sobre los derivados alcoxisilano (Peña-Gómez et al., 2019). Dicho cambio de potencial zeta de los materiales, desde valores negativos de la sílice desnuda a valores positivos de las partículas funcionalizadas confirma la eficiencia del método de funcionalización. Además, es acorde con los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos, como se comentará más adelante, ya que, al generar una carga positiva superficial, las partículas atraen a las bacterias cargadas negativamente mediante fuerzas electrostáticas, produciéndose así el daño en la membrana celular de las bacterias (Ruiz-Rico et al., 2017).

TABLA 1. Potencial zeta (mV) de las partículas de sílice de 200 y 375 μm no funcionalizadas (C) y funcionalizadas con eugenol (E) y ácido ferúlico (F). (Valores promedio y desviación estándar, n=3)

Soporte	Potencial Zeta (mV)
Sílice C200	-2,53 \pm 2,50
Sílice E200	46,1 \pm 0,252
Sílice F200	48,3 \pm 3,81
Sílice C375	-1,41 \pm 0,350
Sílice E375	32 \pm 1,36
Sílice F375	60 \pm 1,17

3.2. Efecto antimicrobiano de los soportes funcionalizados empleados como elementos de filtración sobre el lactosuero

La Figura 1 muestra la reducción de la carga microbiana para aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras, en el suero tras el filtrado a través de las partículas control (desnudas) y las partículas funcionalizadas, con respecto a los niveles iniciales del lactosuero antes de ser sometido al proceso de filtración. Las muestras sin filtrar presentaron un nivel inicial de 4,25 \pm 0,02 log UFC/mL de aerobios mesófilos, 3,64 \pm 0,23 log UFC/mL de psicrófilos y 3,77 \pm 0,39 log UFC/mL de mohos y levaduras. El proceso de filtración a través de las partículas funcionalizadas produjo una importante reducción en el caso de aerobios mesófilos y psicrófilos.

Los aerobios mesófilos incrementaron y disminuyeron levemente para las muestras filtradas a través de las partículas desnudas de 200 y 375 μm , respectivamente. En el caso del eugenol inmovilizado, se alcanzó una reducción de la mitad de la carga bacteriana. Por su parte, las partículas funcionalizadas con ácido ferúlico consiguieron una mayor reducción, llegando a una disminución de 3,3 órdenes logarítmicos para el tamaño de 200 μm (recuentos en lactosuero filtrado: $0,77 \pm 0,53 \log \text{UFC/mL}$) y de 2,5 órdenes logarítmicos para el tamaño 375 μm (recuentos en lactosuero filtrado: $1,62 \pm 0,05 \log \text{UFC/mL}$).

En el recuento de psicrófilos, el comportamiento de los controles fue inverso al caso anterior, donde se presentó un leve incremento en el recuento al filtrar a través de la sílice de 375 μm y una leve disminución con las partículas de 200 μm . El mejor resultado se alcanzó con el ácido ferúlico inmovilizado y el menor tamaño de partícula (F200), con una disminución de 2,9 órdenes logarítmicos (recuentos en lactosuero filtrado: $0,78 \pm 0,54 \log \text{UFC/mL}$), mientras que con el lactosuero que fue filtrado a través de E200 y E375 se obtuvo una disminución de 1,6 y 2 órdenes logarítmicos (recuentos en lactosuero filtrado: $2,1 \pm 0,03 \log \text{UFC/mL}$ y $1,6 \pm 0,7 \log \text{UFC/mL}$), respectivamente. Teniendo en cuenta que *L. monocytogenes*, patógeno causante de infecciones alimentarias con una tasa de mortalidad muy alta, pertenece al grupo microorganismos psicrófilos, hay que destacar que diversos estudios han descrito la actividad antimicrobiana del ácido ferúlico en queso, salmón ahumado (Takahashi et al., 2013) y ensaladas (Takahashi et al., 2015b), presentando éste un efecto antimicrobiano sobre la bacteria y, conllevando un menor riesgo de que la bacteria desarrolle resistencia debido a la exposición. Respecto al eugenol, en algunos trabajos se evidenció que este compuesto inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne de res cocida (Hao et al., 1998), col, cebada, pulpa de papaya (Catherine., et al 2012) y a *Escherichia coli* en zumo de manzana (Peña-Gómez et al., 2019). Sin embargo, en el presente estudio, el eugenol no obtuvo la misma eficacia en su actividad antimicrobiana, lo que podría deberse a que el compuesto actúa de diversas formas en función de cuál sea la matriz alimentaria, además del efecto generado por los diferentes tamaños de partículas empleados en cada estudio.

Respecto a los mohos y levaduras, los resultados mostraron que las partículas de sílice desnudas disminuyeron la carga, especialmente C375 con casi 2 órdenes logarítmicos menos que en el suero sin filtrar. En el caso del eugenol inmovilizado, la reducción para E200 y E375 fue de 2,4 y 2,5 órdenes logarítmicos (recuentos en lactosuero filtrado: $1,3 \pm 0,21 \log \text{UFC/mL}$ y $1,2 \pm 0,31 \log \text{UFC/mL}$), respectivamente. El ácido ferúlico inmovilizado nuevamente fue el compuesto más efectivo, consiguiendo una completa eliminación en F200 y una disminución de 3,3 órdenes logarítmicos para F375.

En general, el tratamiento mediante la filtración con las partículas funcionalizadas fue capaz de reducir la microbiota nativa del lactosuero, mejorando así los resultados obtenidos a partir de otras tecnologías de pasteurización en frío, como la irradiación UV, el procesado a altas presiones, etc. La irradiación UV no garantiza el mismo rendimiento del tratamiento térmico sobre suero concentrado, ya que presenta un efecto de penetración

inferior, no logrando alcanzar la reducción logarítmica de 2 órdenes que se produce al utilizar el tratamiento térmico, (Buhler et al., 2019). En el procesado a altas presiones, es necesario aplicar un tratamiento de hasta 600 MPa para conseguir una inactivación de 7 ciclos logarítmicos, lo que induce la desnaturalización de proteínas de relevancia nutricional (Ramos et al., 2015) y, por su parte, los pulsos eléctricos, han demostrado ser una tecnología que puede ser utilizada para pasteurización selectiva de células de levadura que presentan una mayor sensibilidad a pulsos cortos; sin embargo, los pulsos eléctricos no conducen a una inactivación permanente, como lo hace el tratamiento térmico, por lo cual es importante controlar la temperatura de la muestra tras el tratamiento (Simonis et al., 2019).

De esta parte del estudio se podría concluir que el compuesto que logró una mayor reducción de todos los microorganismos evaluados fue el ácido ferúlico. Según Campos et al. (2009), la exposición de las células bacterianas al ácido ferúlico tiene un efecto tanto en la membrana como en niveles citoplasmáticos, causando una entrada de protones en las células y un flujo de iones de potasio fuera de las mismas, de este modo se reduce el pH intracelular y actúan como venenos protoplasmáticos, hasta causar finalmente la muerte. Además, a pesar de tener estructuras químicas similares con un grupo metoxilo en la posición orto del grupo fenólico, el ácido ferúlico, en comparación con el eugenol, posee una función ácida y propiedades menos hidrofóbicas, conservando su actividad antimicrobiana en emulsiones (Pernin et al., 2019a).

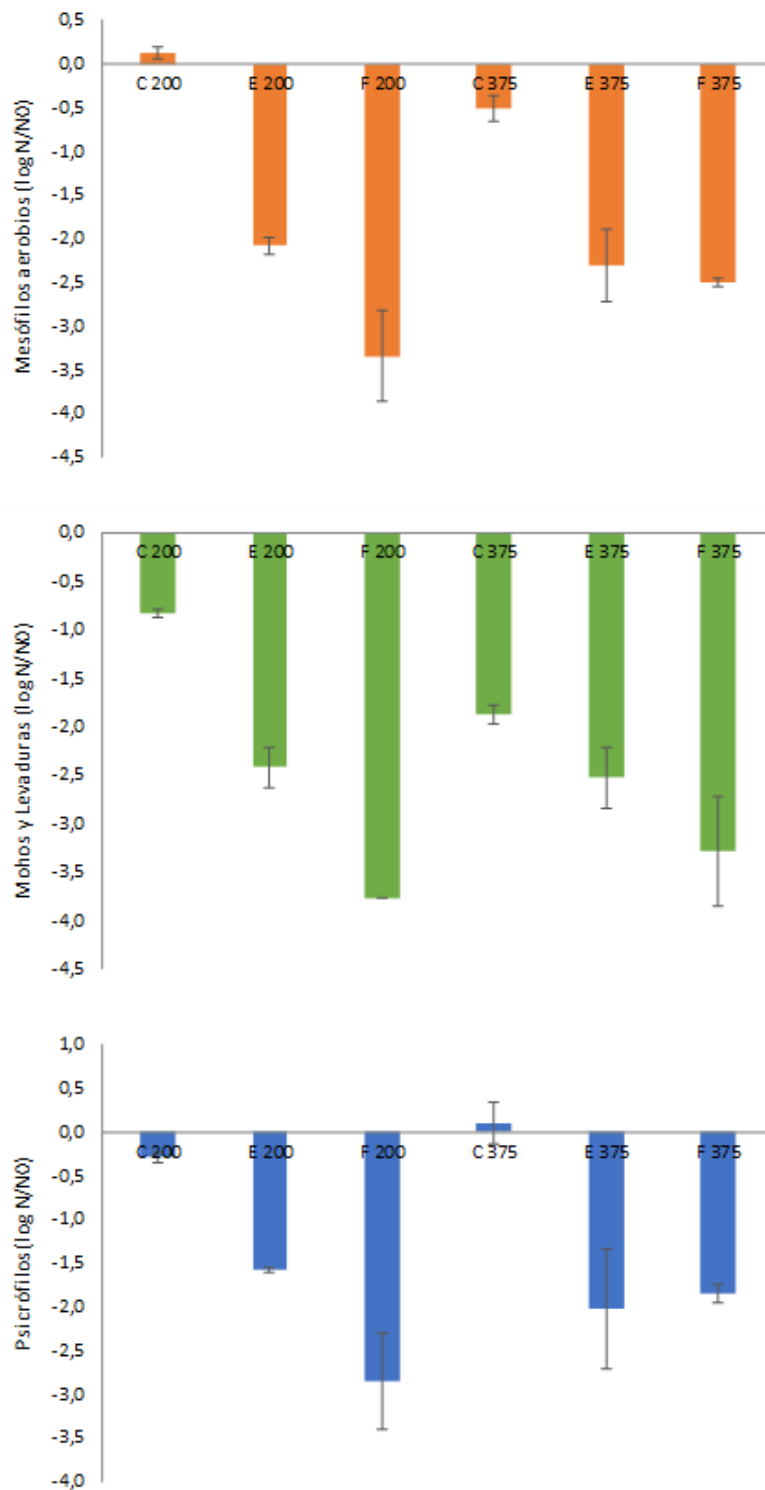


FIGURA 1. Reducción microbiana de aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras de lactosuero tras la filtración a través de partículas de sílice sin funcionalizar (C) y funcionalizadas con eugenol (E) y con ácido ferúlico (F), con dos tamaños de partícula (200 y 375 μm), con respecto a los niveles iniciales de lactosuero antes de ser filtrado. (Valores promedio y desviación estándar, n=3).

Con el objetivo de explicar la influencia de los diferentes factores (tipo de compuesto y tamaño de partícula) sobre el recuento de aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras tras la filtración a través de las partículas funcionalizadas, se realizó un ANOVA multifactor. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico (Tabla 2) indican que el tipo de compuesto tuvo un efecto significativo sobre la reducción de los microorganismos, mientras que el tamaño de partícula de sílice no afectó significativamente al recuento de bacterias. Finalmente se observa que la interacción de ambos factores fue significativa, es decir, el comportamiento de los compuestos era diferente dependiendo del tamaño de partícula empleado.

TABLA 2. Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial de los parámetros microbiológicos, para los factores: tipo de compuesto inmovilizado (CI), tamaño de partícula (Tp) y su interacción.

Parámetros microbiológicos	CI		Tp		CI*Tp	
	F-ratio	α	F-ratio	α	F-ratio	α
Mesófilos	197,63	***	0,01	ns	14,51	***
Psicrófilos	78,76	***	4,43	*	7,48	**
Mohos y Levaduras	121,05	***	3,68	ns	15,06	***

Niveles de significación (α): ns: no existen diferencias significativas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.3. Influencia del proceso de filtración sobre los parámetros fisicoquímicos del lactosuero

En la Tabla 3 se muestran los datos de los parámetros fisicoquímicos de las diferentes muestras de lactosuero evaluadas, así como los resultados del ANOVA multifactorial llevado a cabo.

Como se puede observar, los valores de pH fueron muy similares para las muestras de lactosuero sin filtrar y las filtradas a través de las partículas desnudas (control), observándose un ligero incremento en el lactosuero filtrado a través de partículas de eugenol. Las muestras filtradas a través de ácido ferúlico experimentaron un aumento significativo en el pH, especialmente las filtradas a través de las partículas de 200 μm , en donde se observó un incremento del pH por encima de 5. El ANOVA mostró que tanto el efecto del tipo de compuesto inmovilizado, como el del tamaño de partícula y su interacción, fueron significativos, siendo el tipo de compuesto inmovilizado el que presentó un mayor efecto en esta variable (F-ratio de 283,71).

La variación del porcentaje de ácido láctico entre las diferentes muestras en general fue mínima, a excepción del ácido ferúlico con tamaño de partícula de 200 μm , en donde se observa un ligero descenso en el porcentaje de ácido láctico. El ANOVA multifactor mostró que los dos factores y su interacción, tuvieron un efecto significativo en el contenido de ácido láctico.

El contenido medio de sólidos solubles totales en suero sin filtrar fue de 7, valor muy similar a los datos por Huma et al. (2015), que estableció que el valor medio característico del lactosuero ácido para sólidos solubles totales era de $6,91 \pm 0,43$. La filtración a través de partículas desnudas no supuso prácticamente variación sobre este parámetro. Sin embargo, las muestras filtradas a través de partículas funcionalizadas con eugenol y con ácido ferúlico mostraron una ligera reducción en este parámetro. En este caso, solo el tipo de compuesto tuvo un efecto significativo.

El porcentaje de proteína bruta en el lactosuero sin filtrar presentó un valor promedio de 0,84 (Tabla 3). El proceso de filtrado provocó una disminución en el contenido en proteína, principalmente en las partículas de $375 \mu\text{m}$, independientemente de si estaba o no funcionalizada y del tipo de compuesto.

El promedio del total de nitrógeno concuerda con los resultados de Huma et al. (2015) quien reportó que el valor medio característico del lactosuero ácido para el total de nitrógeno es $0,90 \pm 0,05$. El ANOVA mostró que solo el tamaño de partícula fue significativo en la variación del porcentaje de proteína. Esta disminución podría ser una desventaja del método de filtración, aunque, por el contrario, Huma et al. (2015) demostró que diferentes materiales y tamaños de poro en ultrafiltración, generan resultados eficientes en términos de composición del suero y rendimiento del proceso, lo que supondría una ventaja del método de filtración respecto a los métodos convencionales.

Otro parámetro de calidad evaluado en este estudio fue el color. Todos los valores para L^* (luminosidad) fueron positivos, mostrando fluctuaciones poco importantes entre muestras, que indican que el proceso de filtrado no parece tener una clara influencia en esta variable. Para las coordenadas de color a^* todos los resultados fueron negativos indicando que las muestras expresan inclinación hacia el color verde, lo que sugiere que el lactosuero filtrado puede contener pequeñas cantidades de riboflavina, que influye en el color verdoso (Marcelo y Rizvi, 2008). Aunque se observaron cambios en los valores de la coordenada a^* , no se puede establecer de forma clara cuál es el efecto de la filtración, del tipo de compuesto o del tamaño de partícula sobre esta variable. Los valores de la coordenada b^* obtenidos indican un estándar de color amarillo para las muestras. El lactosuero sin filtrar presentó un valor b^* de 9,41 y se observó un incremento del color amarillo de las muestras filtradas a través de las partículas funcionalizadas con eugenol y un descenso en las filtradas a través de ácido ferúlico, especialmente acusado para las partículas de menor tamaño. Los cambios de a^* y b^* más acusados se observaron en las muestras de lactosuero filtradas a través de partículas de sílice de $200 \mu\text{m}$ funcionalizadas con ácido ferúlico.

TABLA 3. Parámetros fisicoquímicos de muestras de lactosuero sin filtrar y tras la filtración a través de partículas de sílice sin funcionalizar (C) y funcionalizadas con eugenol (E) y con ácido ferúlico (F), con dos tamaños de partícula (200 y 375 μm), y resultados del análisis multifactor (ANOVA) realizado para los factores: tipo de compuesto inmovilizado (CI), tamaño de partícula (Tp) y su interacción.

Parámetros fisicoquímicos	MUESTRA							ANOVA					
	Suero	C200	E200	F200	C375	E375	F375	CI		Tp		CI*Tp	
								F-ratio	α	F-ratio	α	F-ratio	α
pH	4,72± 0,01	4,72±0,01	4,85±0,10	5,64± 0,01	4,57±0,01	4,82±0,03	4,94±0,09	283,71	***	193,06	***	80,66	***
%Ácido láctico	0,44± 0,01	0,42±0,01	0,42±0,03	0,38± 0,03	0,45±0,02	0,42±0,02	0,42±0,02	7,46	**	15,95	***	3,39	*
°Brix	7,00± 0,10	6,92±0,15	6,65±0,26	6,30± 0,2	6,98±0,24	6,67±0,52	6,75±0,22	5,5	**	2,74	ns	1,43	ns
%Proteína	0,84±0,06	0,66±0,04	0,64±0,11	0,70±0,07	0,55±0,04	0,58±0,01	0,53±0,06	0,02	ns	17,09	**	1,55	ns
L*	37,20± 1,2	36,57±1,18	38,26±1,21	38,97± 1,4	34,77±1,38	37,87±1,48	38,44±2,09	12,16	***	2,85	ns	0,77	ns
a*	-1,70± 0,03	-1,37±0,11	-1,44±0,15	-0,94± 0,20	-0,99±0,27	-1,49±0,20	-1,77±0,09	7,58	**	6,9	*	27,89	***
b*	9,41± 0,38	8,71±0,81	9,61±0,90	4,62± 0,40	9,50±0,47	9,85±1,13	8,87±0,61	36,17	***	38,07	***	17,07	***

Niveles de significación: *** p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns: no significativo

Con el fin de establecer las diferencias de color en las muestras estudiadas, se realizó el cálculo de la diferencia de color total mediante la Ecuación 1, respecto a las muestras control y respecto a la muestra sin filtrar. Los resultados de las diferencias de color se presentan en la Tabla 4. En un análisis colorimétrico, generalmente se considera que una muestra es igual a otra si su valor ΔE calculado, es igual o menor que 1 (Marcelo y Rizvi, 2008), aunque es apreciable al ojo humano a partir de los 5. Teniendo en cuenta estos valores, respecto al efecto de la filtración, se puede observar, que en general todas las muestras filtradas presentaron valores iguales o superiores a 1, lo que indica que hay un cambio de color por el simple proceso de filtrado. En relación al efecto del tipo de compuesto, el ácido ferúlico tuvo una influencia mayor en el cambio de color que el eugenol. En cuanto al tamaño de partícula, se observan diferentes resultados según el tipo de compuesto. Así, para el ácido ferúlico, las partículas de 200 μm supusieron un mayor cambio de color, mientras que para las muestras control fue, al contrario, presentando resultados contradictorios las muestras filtradas a través de partículas de eugenol.

Cabe destacar las importantes diferencias de color obtenidas en el lactosuero filtrado empleando las partículas de sílice de 200 μm funcionalizadas con ácido ferúlico. Este tratamiento fue el que indujo también mayores cambios en el pH, % de ácido láctico, °Brix y el que menos afectó al contenido proteico. Por otra parte, fue el tratamiento que consiguió una mayor reducción microbiana de todos los microorganismos evaluados.

TABLA 4. Diferencias de color (ΔE) del lactosuero antes de ser filtrado y tras el filtrado a través de un lecho de partículas de sílice no funcionalizadas (C) y funcionalizadas con eugenol (E) y ácido Ferúlico (F), con dos tamaños de partícula (200 y 375 μm).

	ΔE (Control)	ΔE (Suero)
Suero	1,00 (C200) y 2,54 (C375) ^b	-
C200	-	1,00
E200	1,92	1,11
F200	4,76	5,16
C375	-	2,54
E375	3,16	0,83
F375	3,80	1,35

3.4. Análisis de componentes principales (PCA)

En la Figura 3 se observa el diagrama obtenido mediante el análisis de componentes principales, que informa sobre las diferencias entre muestras, así como sobre las variables que más contribuyen a estas diferencias. En la Figura 3 se puede observar que los dos primeros componentes principales (F1 y F2) explican el 81,85% de la variación total. El componente principal más importante (PC1) explica el 65,19% de la variación total. Según este eje, se podrían clasificar las muestras en tres grupos. El primero de ellos, formado por el lactosuero sin filtrar y las dos muestras control, que es el que presenta mayores valores en el eje F1. El segundo grupo estaría formado por las muestras filtradas a través de eugenol con los dos tamaños de partícula, más las muestras filtradas a través de

partículas funcionalizadas con ácido ferúlico de 375 μm . Por último, la muestra F200 (ácido ferúlico y tamaño de partícula 200 μm), quedaría en la parte más negativa del eje F1. Si se observa la ubicación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos evaluados, también, según este eje, se podrían hacer 3 grupos, siendo el primero de ellos el que está ubicado en los valores más altos de la parte más positiva del eje F1, compuesto por los factores: mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras, °Brix, % ácido láctico y b^* . Esto significa que las muestras de suero sin filtrar y los dos controles, en general, son los que presentan mayores valores de estos parámetros (mayores recuentos microbianos), siendo la muestra F200 la que presentaría los menores valores y, por tanto, la que habría provocado un mayor cambio tanto en los recuentos microbianos (mejor calidad microbiológica) como en los parámetros fisicoquímicos evaluados. Un segundo grupo estaría formado por el pH, L^* y a^* , que se sitúan en la parte negativa del eje F1 y, por último, el % de proteínas que se sitúa en valores cercanos a 0 en este eje y que también queda separado del resto de grupos, según el eje F2. Los tratamientos E200, E375 y F375, agrupados en la parte negativa del eje F1 y del eje F2, quedan entre las muestras control y sin filtrar, y las muestras F200, lo que indica que, provocan una reducción microbiana y cambios de algunos de los parámetros fisicoquímicos estudiados, pero en menor medida que el tratamiento que emplea partículas de sílice de 200 μm funcionalizadas con el ácido ferúlico.

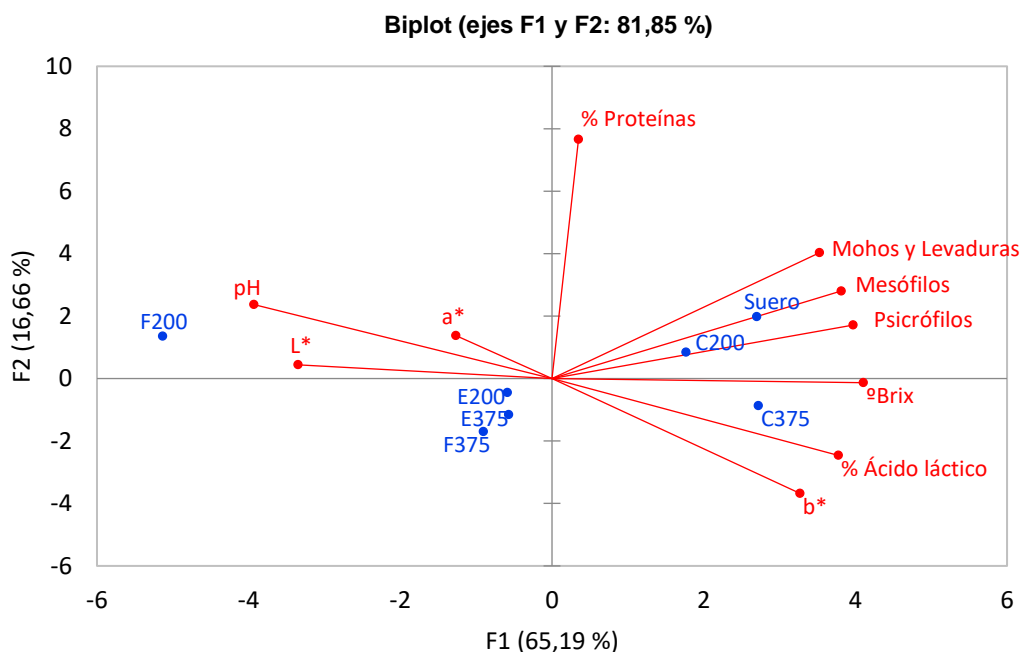


FIGURA 3. Análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del lactosuero antes de ser filtrado y tras el filtrado a través de un lecho de partículas de sílice no funcionalizadas (C) y funcionalizadas con eugenol (E) y Ácido Ferúlico (F), con dos tamaños de partícula (200 y 375 μm).

4. CONCLUSIONES

El tratamiento mediante filtración a través de micropartículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales ha sido capaz de reducir la microbiota nativa del lactosuero. El uso de las partículas funcionalizadas con ácido ferúlico ha resultado ser el más adecuado, ya que ha eliminado gran porcentaje de la carga microbiana del producto; sin embargo, ha afectado al color, al pH, aunque ha sido el que menos ha afectado al contenido proteico. Las muestras filtradas a través de partículas funcionalizadas con eugenol han mostrado menor variación de los parámetros fisicoquímicos, aunque su capacidad antimicrobiana ha sido más baja que la que presenta el compuesto ácido ferúlico. Este estudio demuestra que el sistema de pasteurización en frío desarrollado tiene un amplio potencial en el tratamiento de lactosuero, permitiendo una mejora en la calidad microbiológica, el cual podría ser también aplicado a otros alimentos líquidos, como leche, zumos o vino. Sin embargo, es necesario optimizar la metodología para evitar un impacto negativo sobre las propiedades fisicoquímicas, así como incluir estudios con patógenos, para garantizar su eficacia como método de pasteurización en frío. En futuras investigaciones se podría evaluar la sinergia de los compuestos, llevar a cabo análisis organolépticos, así como estudios de vida útil y evaluar la posible lixiviación, para garantizar la no liberación de los compuestos a la matriz alimentaria.

5. REFERENCIAS

- Addinsoft, 2019. XLSTAT statistical and data analysis solution. Long Island, NY, USA. <https://www.xlstat.com>.
- AOAC International: "Official Methods of Analysis". 17^aed. Gaithersburg, USA, 2000.
- Bacenetti, J.; Bava, L.; Schievano, A.; Zucali, M. 2018. Whey protein concentrate (WPC) production: Environmental impact assessment. *Journal of Food Engineering*, Volume 224, Pages 139-147
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256-265.
- Buhler, S.; Solari, F.; Gasparini, A.; Montanari, R.; Sforza, S.; Tedeschi, T. 2019. UV irradiation as a comparable method to thermal treatment for producing high quality stabilized milk whey. *LWT*, Volume 105, Pages 127-134
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in food – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, pp. 223-253
- Campos, F.M.; Couto, J.A.; Figueiredo, A.R.; Tóth, I.V.; Rangel, A.O.S.S.; Hogg, T.A. 2009. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 135, Issue 2, Pages 144-151.
- Catherine, A. A.; Deepika, H.; Negi, P.S. 2012. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *Journal of Essential Oil Research*, 24:5, 481-486.
- De Wit, J.N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, Volume 81, Pages. 597-608.
- Dissanayake, M.; Kasapis, S.; George, P.; Adhikari, B.; Palmer, M.; Meurer, B. 2013. Hydrostatic pressure effects on the structural properties of condensed whey protein/lactose systems. *Food Hydrocolloids*, Volume 30, Issue 2, Pages 632-640.
- Hao, Y.; Brackett, R. E.; Doyle, M. P. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by Plant Extracts in Refrigerated Cooked Beef. *Journal of Food Protection*: March 1998, Vol. 61, No. 3, pp. 307-312.
- Hayes, K.D.; Nielsen, S.S. 2000. Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Commercial Whey Protein Products. *Journal of Dairy Science*, Volume 83(1), Issue 3, 387-394.

- Hu, Q.; Zhou, M.; Wei, S. 2018. Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field. *Journal of Food Science*, 83: 1476-1483
- Huma, N.; Pasha, I.; Sarwar, M.; Ahmad, S.; Shah, F. 2015. Effect of different filtration membranes on composition of sweet and acid whey protein. 25. 79-85.
- Huppertz, T.; Vasiljevic, T.; Zisu, Bogdan.; Deeth, Hilton. 2019. Chapter 8 - Novel Processing Technologies: Effects on Whey Protein Structure and Functionality. *Whey Proteins*, Academic Press, Pages 281-334.
- Kumar, N.; Pruthi, V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, Volume 4, Pages 86-93.
- Marcelo, P. A.; Rizvi, S.H. 2008. Physicochemical properties of liquid virgin whey protein isolate. *International Dairy Journal*, Volume 18, Issue 3, Pages 236-246.
- Mohammad, A.W.; Teow, Y.H.; Ang, W.L.; Chung, Y.T.; Oatley-Radcliffe, D.L.; Hilal, N. 2015. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. *Desalination*, Volume 356, Pages 226-254
- Palou, E.; Lopez-Malo, A.; Barbosa-Canovas, G. V.; Swanson, B. G. 2004. High-pressure treatment in food preservation. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 167, 815.
- Parra, R. A. 2009. Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional De Agronomía Medellín*, 62(1), 4967-4982.
- Peña-Gómez, N.; Ruiz-Rico, M.; Fernández-Segovia, I; Barat, J. M. 2019. Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles functionalised with essential oil components. *Food Control*, Volume 106.
- Pernin, A.; Bosc, V.; Maillard, M.N.; Dubois-Brissonnet, F.; 2019a. Ferulic Acid and Eugenol Have Different Abilities to Maintain Their Inhibitory Activity Against *Listeria monocytogenes* in Emulsified Systems. *Frontiers in Microbiology*, Volume 10, page 137.
- Pernin, A.; Guillier, L.; Dubois-Brissonnet, F. 2019b. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiology*, Volume 80, Pages 18-24.
- Playne, M.; Bennett, L.; Smithers, G. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, Volume 58, Pages 242-264.
- Ramos, S. J.; Chiquirín, M.; García, S.; Condón, S.; Pérez, M. D. 2015. Effect of high-pressure treatment on inactivation of vegetative pathogens and on denaturation of whey proteins in different media. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 63, Issue 1, Pages 732-738.
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., & Barat, J. M. (2019). Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *LWT*, 113, 108326
- Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Bernardos, A.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M. D.; Barat, J. M. 2017. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, Volume 233, Pages 228-236.
- Simonis, P.; Kersulis, S.; Stankevich, V.; Sinkevich, K.; Striguniene, K.; Ragoza, G.; Stirke, A. 2019. Pulsed electric field effects on inactivation of microorganisms in acid whey. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 291, Pages 128-134.
- Takahashi, H.; Kashimura, M.; Koiso, H.; Kuda, T.; Kimura, B. 2013. Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food. *Food Control*, Volume 33, Issue 1, Pages 244-248.
- Takahashi, H.; Takada, K.; Tsuchiya, T.; Miya, S.; Kuda, T.; Kimura, B. 2015a. *Listeria monocytogenes* develops no resistance to ferulic acid after exposure to low concentrations. *Food Control*, Volume 47, Pages 560-563.
- Takahashi, H.; Takahashi, T.; Miya, S.; Yokoyama, H.; Kuda, T.; Kimura, B. 2015b. Growth inhibition effects of ferulic acid and glycine/sodium acetate on *Listeria monocytogenes* in coleslaw and egg salad. *Food Control*, Volume 57, Pages 105-109.
- Wen-Qiong, W.; Yun-Chao, W.; Xiao-Feng, Z.; Rui-Xia, G.; Mao-Lin, L. 2019. Whey protein membrane processing methods and membrane fouling mechanism analysis. *Food Chemistry*, Volume 289, Pages 468-481.
- Zhao, Y.; Trewyn, B.G.; Slowing, I.I.; Lin, V.S.-Y. 2009. Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Double Drug Delivery System for Glucose-Responsive Controlled Release of Insulin and Cyclic AMP. *Journal of the American Chemical Society* 131, 8398–8400.