

# Universitat Politècnica de València

ESCUELA DE DOCTORADO



## **EFECTO DEL TRATAMIENTO POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (HHP) EN LA CALIDAD DE QUESO FRESCO Y EN LAS PROTEÍNAS DE SUERO DE QUESERÍAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Autor: Edwin Fabián Torres Bello**

**Director: Antonio Martínez López**

**Centro: IATA-CSIC**

**Valencia, Junio 2016**

D. Antonio Martínez López, Investigador titular en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas

HACE CONSTAR QUE:

El trabajo de investigación titulado “**EFFECTO DEL TRATAMIENTO POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (HHP) EN LA CALIDAD DE QUESO FRESCO Y EN LAS PROTEÍNAS DE SUERO DE QUESERIAS**” que presenta D. Edwin Fabián Torres Bello por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo mi dirección y que reúne las condiciones para optar al grado de Doctor.

Valencia, 22 de junio de 2016

Fdo: D. Antonio Martínez López

A todas aquellas personas que hicieron  
posible cumplir esta meta.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, a mi hermana y a toda mi familia por el apoyo recibido durante todo este gran aprendizaje, a David por estar en todos los buenos y malos momentos, por la ayuda recibida, por las noches de lectura, corrección y por el aprendizaje mutuo.

A mi director de Tesis el D. Antonio Martínez por el apoyo recibido durante mi formación y por abrirme las puertas del instituto para poder cumplir una de mis tantas metas.

A todos mis amigos por tener tanta paciencia y por estar siempre a mi lado cuando lo he necesitado.

A Alpina productos alimenticios S.A por aportar la financiación para realizar y desarrollar el presente trabajo.

A los diferentes estudiantes y personas que colaboraron de alguna manera para cumplir este gran proyecto.

A la Universitat Politècnica de València por el acompañamiento en las diferentes etapas del presente trabajo.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, por permitirme ser parte de un gran grupo de trabajo.



# RESUMEN

La tecnología de las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) emergió hace varios años como respuesta al interés de los consumidores por disponer de productos de una mayor calidad organoléptica y nutricional que los tradicionalmente procesados por calor. La industria agroalimentaria inicialmente mejoró sus procesos de conservación por calor desarrollando los tratamientos continuos HTST, UHT y el envasado aséptico. Sin embargo, a pesar de estas mejoras los productos alimenticios conservados por calor siguen presentando pérdidas en su calidad final.

Aunque al principio la aplicación de las Altas Presiones Hidrostáticas en el campo de la alimentación se enfocó hacia la conservación, con el desarrollo de la tecnología y la investigación alrededor de ella han surgido nuevas aplicaciones que la hacen muy interesante para el sector. En este contexto, el objetivo de la presente tesis doctoral ha sido la aplicación de las Altas Presiones Hidrostáticas en la conservación de queso fresco y en la revalorización de subproductos de queserías. Para ello, se evalúa el efecto de los tratamientos por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) sobre microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) y alteradores (*Rhodotorula glutinis*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Pseudomonas fluorescens*) de productos lácteos y el efecto de diversos factores presentes en los alimentos (cloruro sódico (NaCl), temperatura inicial de tratamiento) sobre la inactivación microbiana. Para estudiar este efecto se utilizó como medio de referencia agua peptona a concentraciones de 0; 0,1;

0,5; 0,8% de NaCl y como matriz compleja queso fresco con un contenido de 0,5% de NaCl. Se utilizaron intervalos de presión entre 200 y 550 MPa (Megapascales) con tiempos de tratamiento cortos (en el orden de segundos a varios minutos), combinados con una temperatura inicial moderada de 20 a 50 °C. Los resultados de inactivación microbiana se ajustaron al modelo matemático que mejor describía el comportamiento de las curvas de inactivación, lo que permite predecir el comportamiento de los microorganismos frente a las HHP y bajo los diferentes factores. En cuanto a las HHP para *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum* tratamientos en torno a los 350 - 400 MPa generaron más de 5 reducciones log<sub>10</sub> de la carga inicial. La concentración de NaCl presente en el medio de referencia para estos dos microorganismos fue un factor adicional de control. Con respecto al efecto del medio de trabajo se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores medios obtenidos para el medio de referencia y la matriz compleja (queso fresco): el queso fresco presentó una menor reducción en la carga inicial inoculada.

La pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes* y *Ps. fluorescens* incrementó significativamente a medida que se disminuyó la concentración de NaCl y se incrementó la presión y el tiempo de tratamiento, obteniendo a concentraciones de 0 y 0,8% NaCl reducciones entre 6,0 y 4,6 ciclos log<sub>10</sub>, respectivamente, con un tratamiento a 450 MPa a 20 °C por 1 min. Para *S. aureus* la máxima reducción obtenida a 0 y 0,1% de NaCl fue 3,6 ciclos log<sub>10</sub>. Un incremento en la concentración de NaCl (0,5 y 0,8%) produjo una menor reducción de la carga inicial (2,2 ciclos log<sub>10</sub>), produciendo por tanto una protección del microorganismo. A la presión de 550 MPa durante 7 minutos este microorganismo demostró ser resistente a los tratamientos por HHP. *L.*

*monocytogenes* y *Ps. fluorescens* inoculados en queso fresco presentaron una menor resistencia a los tratamientos por HHP que aquellos tratados en un medio simple (agua peptona 0,5% NaCl). En cuanto a *S. aureus* el queso fresco proporcionó una barrera frente a las HHP. Esta resistencia varía de acuerdo a los parámetros de tratamiento (tiempo-presión), indicando por tanto una cierta protección del medio.

Debido a los procesos productivos de la fabricación del queso se genera gran cantidad de suero lácteo residual que es un problema bajo el punto de vista medioambiental. En esta tesis también se estudió la utilización del suero lácteo líquido residual en conjunto con aislados proteicos del suero (WPI) con la finalidad de producir geles con un elevado valor biológico mediante diversos procesos de HHP. Las diversas mezclas de suero de queso junto con los porcentajes de 5, 7, 11, 15% p/v de WPI procesadas por HHP dieron lugar a geles con diversas características. Los valores de pH, color ( $L^*a^*b^*$ ) variaron ligeramente dependiendo directamente tanto de la concentración de WPI como del tiempo de almacenamiento. Los valores de dureza y gomosidad sufrieron modificaciones dependiendo del medio líquido y la concentración de WPI. La utilización de suero de queso para la formación del gel favoreció la retención de agua, reduciendo significativamente la sinéresis en refrigeración.

Este estudio muestra el potencial de las HHP como una medida de control, demostrándose la efectividad de estos tratamientos para prolongar la vida útil de los quesos frescos y como técnica no convencional para generar nuevas texturas que pueden tener gran interés industrial al mismo tiempo que se revalorizan residuos de la industria quesera.



# RESUM

La tecnologia de les altes pressions hidrostàtiques va emergir fa diversos anys com a resposta a l'interés dels consumidors per disposar de productes d'una qualitat organolèptica i nutricional major que la dels processats per calor tradicionalment. La indústria agroalimentària inicialment va millorar els seus processos de conservació per calor desenvolupant els tractaments continus HTST, UHT i l'envasat asèptic. No obstant això, malgrat aquestes millores els productes alimentaris conservats per calor continuen presentant pèrdues en la seua qualitat final.

Tot i que al principi l'aplicació de les altes pressions hidrostàtiques en el camp de l'alimentació es va enfocar cap a la conservació, amb el desenvolupament de la tecnologia i la investigació al voltant d'ella han sorgit noves aplicacions que la fan molt interessant per al sector. En aquest context, l'objectiu de la present tesi doctoral ha sigut l'aplicació de les altes pressions hidrostàtiques en la conservació del formatge fresc i en la revalorització de subproductes de formatgeries. Per a això, s'avalua l'efecte dels tractaments per altes pressions hidrostàtiques (HHP) sobre microorganismes patògens (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) i alteradors (*Rhodotorula glutinis*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Pseudomonas fluorescens*) de productes lactis i l'efecte de diversos factors presents als aliments (clorur sòdic (NaCl), temperatura inicial de tractament) sobre la inactivació microbiana. Per a estudiar aquest efecte es va utilitzar com a medi de referència aigua peptona a concentracions de 0; 0,1; 0,5;

0,8% de NaCl i com a matriu complexa formatge fresc amb un contingut de 0,5% de NaCl. Es van utilitzar intervals de pressió entre 200 y 550 MPa (Megapascals) amb temps de tractament curts (en l'orde de segons a diversos minuts), combinats amb una temperatura inicial moderada de 20 a 50 °C. Els resultats d'inactivació microbiana es van ajustar al model matemàtic que millor descrivia el comportament de les corbes d'inactivació, el que permet predir el comportament dels microorganismes front a les HHP i baix els diferents factors. En referència a les HHP per a *R. glutinis* i *P. aurantiogriseum* tractaments al voltant dels 350 – 400 MPa van generar més de 5 reduccions  $\log_{10}$  de la càrrega inicial. La concentració de NaCl present en el medi de referència per a aquests dos microorganismes va ser un factor addicional de control. Respecte a l'efecte del medi de treball es van observar diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre els valors mitjans obtinguts per al medi de referència i la matriu complexa (formatge fresc): el formatge fresc va presentar una menor reducció en la càrrega inicial inoculada.

La pèrdua de viabilitat de *L. monocytogenes* i *Ps. fluorescens* va incrementar significativament a mesura que es va disminuir la concentració de NaCl i es va incrementar la pressió i el temps de tractament, obtenint a concentracions de 0 i 0,8% NaCl reduccions entre 6,0 i 4,6 cicles  $\log_{10}$ , respectivament, amb un tractament a 450 MPa a 20 °C per 1 min. Per a *S. aureus* la màxima reducció obtinguda a 0 i 0,1% de NaCl va ser 3,6 cicles  $\log_{10}$ . Un increment en la concentració de NaCl (0,5 i 0,8%) va generar una menor reducció de la càrrega inicial (2,2 cicles  $\log_{10}$ ), produint, per tant, una protecció del microorganisme. A la pressió de 550 MPa durant 7 minuts aquest microorganisme va demostrar ser

resistent als tractaments per HHP. *L. monocytogenes* i *Ps. fluorescens* inoculats en formatge fresc van presentar una menor resistència als tractaments per HHP que aquells tractats en un medi simple (aigua peptona 0,5% NaCl). En quant a *S. aureus* el formatge fresc va proporcionar una barrera front a les HHP. Aquesta resistència varia d'acord als paràmetres de tractament (temps-pressió), indicant per tant una certa protecció del medi.

Degut als processos productius de la fabricació del formatge es genera gran quantitat de sèrum lacti residual que és un problema baix el punt de vista mediambiental. En aquesta tesi també es va estudiar la utilització del sèrum lacti líquid residual en conjunt amb aïllats proteics del sèrum (WPI) amb la finalitat de generar gels amb un elevat valor biològic mitjançant diversos processos de HHP. Les diverses mescules de sèrum de formatge juntament amb els percentatges de 5, 7, 11, 15% p/v de WPI processades per HHP van generar gels amb diverses característiques. Els valors de pH, color ( $L^*a^*b^*$ ) van variar lleugerament depenent directament tant de la concentració de WPI com del temps d'emmagatzematge. Els valors de duresa i gomositat van sofrir modificacions depenent del medi líquid i la concentració de WPI. La utilització del sèrum de formatge per a la formació del gel va afavorir la retenció d'aigua, reduint significativament la sinèresi en refrigeració.

Aquest estudi mostra el potencial de les HHP com a una mesura de control, demostrant-s'hi l'efectivitat d'aquests tractaments per a prolongar la vida útil dels formatges frescos i com a tècnica no convencional per a generar noves textures que poden tindre gran interès industrial alhora que es revaloritzen residus de la indústria formatgera.

# ABSTRACT

High Hydrostatic Pressure technology emerged several years ago in response to consumer interest for products having greater organoleptic and nutritional quality than those traditionally processed by heat. The food industry initially improved preservation processes developing continuous heat treatment HTST, UHT and aseptic packaging. However, despite these improvements foodstuffs preserved by heat still have quality losses.

Although initially the application of High Hydrostatic Pressure in the field of food was focused towards preservation, with the development of technology and research around new applications raised that make it very interesting for the sector.

In this context, the aim of this thesis has been the application of High Hydrostatic Pressure on the preservation of fresh cheese and the revalorization of by-products from cheese factories. For this, the effect of treatments by high hydrostatic pressure (HHP) on pathogenic microorganisms (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) and spoilage microorganisms (*Rhodotorula glutinis*, *aurantiogriseum Penicillium*, *Pseudomonas fluorescens*) that are present in lactic products is evaluated as well as the effect of various factors (sodium chloride (NaCl), initial treatment temperature) on microbial inactivation.

To study this effect peptone water at concentrations of 0; 0.1; 0.5; 0.8% NaCl was used as reference medium and fresh cheese as complex matrix containing 0.5% NaCl. Pressure ranges between 200 and 550 MPa (Megapascals) were

used with short treatment times (in the order of seconds to several minutes), combined with a moderate initial temperature of 20 to 50 °C.

The results of microbial inactivation were fitted to the mathematical model that best described the behavior of inactivation curves, allowing predicting the behavior of the microorganisms being treated by HHP under different environmental factors. Treatments by HHP of *R. glutinis* and *P. aurantiogriseum* around 350 - 400 MPa generated more than 5 log<sub>10</sub> reductions on the initial contamination. The NaCl concentration present in the reference medium for these two microorganisms was an additional control factor. Regarding the effect of the substrate significant differences between the mean values obtained for the reference medium and the complex matrix (cheese) were observed, fresh cheese showed a lower reduction in the initial inoculated load.

The loss of viability of *L. monocytogenes* and *Ps. fluorescens* increased significantly as the concentration of NaCl was decreased and the pressure and treatment time increased, obtaining at concentrations of 0 and 0.8% NaCl reductions between 6.0 and 4.6 log<sub>10</sub> cycles respectively, with treatment at 450 MPa at 20 °C for 1 min. For *S. aureus* the greatest reduction obtained at 0 and 0.1% NaCl was 3.6 log<sub>10</sub> cycles. An increase in the NaCl concentration (0.5 and 0.8%) produced less reduction on the initial load (2.2 log<sub>10</sub> cycles), maybe due to a protection of the microorganisms by salt. At the treatment of 550 MPa for 7 minutes this organism proved to be high resistant to the treatment by HHP.

*L. monocytogenes* and *Ps. fluorescens* inoculated in fresh cheese had a lower resistance to HHP treatments than those treated in the reference medium (peptone water 0.5% NaCl). Regarding to *S. aureus* fresh cheese provided some protection against HHP. This resistance varied according to treatment parameters (time-pressure).

Due to the production processes of cheesemaking large amount of residual whey generated is a problem under the environmental point of view. In this thesis the use of residual liquid whey was also studied in conjunction with whey protein isolates (WPI) for the purpose of producing gels with a high biological value through various HHP processes. The various mixtures of whey and different percentages of WPI (5, 7, 11, 15% w/v) processed by HHP resulted in gels with different characteristics.

The pH values, color ( $L^* a^* b^*$ ) vary slightly directly depending on the WPI concentration and the storage time. The hardness values and gumminess were modified depending on the liquid medium and the concentration of WPI. The use of cheese whey to gelation favored water retention, significantly reducing the syneresis under refrigeration.

This study shows the potential of HHP as control measure, demonstrating the effectiveness of these treatments to prolong the shelf life of fresh cheeses and as unconventional technique to generate new textures that can have great industrial interest at the same time that revalorize some wastes from the cheese industry



# ÍNDICE



INTRODUCCIÓN.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	52
OBJETIVOS .....	55
CAPÍTULO I.....	58
Efecto del cloruro sódico en la inactivación de levaduras y mohos por Altas Presiones Hidrostática.....	58
CAPÍTULO II .....	106
Efecto del cloruro sódico (NaCl) en la inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) de bacterias patógenas y alteradoras.....	106
CAPÍTULO III .....	135
Influencia del tratamiento de Altas Presiones sobre bacterias patógenas y alteradoras y las características fisicoquímicas del queso fresco.....	135
CAPÍTULO IV .....	166
Revalorización del lactosuero de queso como coadyuvante en la gelificación de aislado proteico de suero lácteo (WPI) mediante Altas Presiones Hidrostáticas.....	166
CONCLUSIONES.....	189
ANEXOS .....	197

# **INTRODUCCIÓN**

Torres E.F., Martínez, G. G., Ceberio, B. F. K., Rodrigo, D., & Martínez, A. (2014). High Pressure Treatment in Foods. *Foods*, 3(3), 476-490.

Torres E.F., Martínez, A. & Rodrigo D (2015). *Encyclopedia of Food and Health*, Chapter: Preservation of Food, Academic Press, Elsevier Ltd, Editors: Caballero B, Finglas P, Toldrá F, pp.491-496. ISBN: 9780123849472

Actualmente los consumidores a nivel mundial presentan una mayor sensibilidad hacia la calidad y seguridad en los alimentos que consumen diariamente en especial aquellos que les aportan una sensación de productos saludables. Para satisfacer estas demandas la industria agroalimentaria ha mejorado en los últimos años sus procesos de conservación por calor desarrollando los tratamientos continuos a Alta Temperatura Corto Tiempo (HTST) y Ultra Alta Temperatura (UHT), y el envasado aséptico. A pesar de estas mejoras los productos alimenticios conservados mediante estas tecnologías de procesado siguen presentando pérdidas en su calidad final. Por otro lado, el consumo de productos mínimamente procesados se ha incrementado notablemente (Chawla et al.2011; Hiperbaric S.A, 2014). Este tipo de productos conservan en gran medida las características, nutricionales y de sabor, manteniendo el nivel de inocuidad exigido, con una vida útil de almacenamiento compatible con la actividad industrial (Chevalier et al. 2001).

Los alimentos mínimamente procesados se han ido desarrollando a la par que se han desarrollado diferentes tecnologías de conservación. Dentro de este grupo podemos encontrar las denominadas ‘tecnologías no térmicas de conservación’, que son aquellas que no utilizan la temperatura como principal forma de inactivación de microorganismos y enzimas. Si bien es cierto que en la mayoría de estos tratamientos se produce un leve incremento de la temperatura,

este nunca llega a ser tan elevado como en un tratamiento térmico. Entre estas nuevas tecnologías se encuentran los campos magnéticos oscilatorios, pulsos eléctricos de alta intensidad, ultrasonidos de alta intensidad, la irradiación y las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP). De todo este abanico de tecnologías, el tratamiento por HHP ha demostrado, en el procesado de alimentos envasados, que es capaz de conservar en gran medida las propiedades sensoriales y nutritivas, a la vez que produce niveles adecuados de inactivación de microorganismos y enzimas.

### **Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP)**

El objetivo principal de esta tecnología no térmica es procesar alimentos que conserven al máximo todas las características de frescura y sabor, sin renunciar a la seguridad alimentaria. Las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) en la actualidad están adquiriendo una gran relevancia, ya que en los últimos años esta tecnología se ha incorporado como alternativa al tratamiento térmico en el procesado. Actualmente esta tecnología no térmica se está utilizando de forma comercial para productos cárnicos en lonchas, ostras crudas, jaleas de fruta y mermeladas, zumos de fruta, aliños para la ensalada, calamar crudo, pasteles de arroz, hígado de pato, jamón y guacamole, platos preparados, entre otros, obteniendo resultados muy interesantes en inactivación de microorganismos y enzimas sin alterar su calidad final (Polydera et al. 2003). Por porcentaje de utilización podemos decir que estos equipos están siendo utilizados principalmente para el procesado de productos vegetales (28%), cárnicos (26%), mariscos y pescados (15%), zumos y bebidas (14%) y otros productos (17%), generando una producción global de alimentos en 2012 superior a los 350.000.000 Kg, según los datos publicados por Hiperbaric S.A, (2014).

Todo ello hace que las HHP sean la tecnología no térmica de conservación de alimentos más desarrollada comercialmente, con muy buena aceptación por parte de los consumidores, que valoran las características organolépticas de los productos tratados por presión, ya que los asocian a productos naturales y con muy poca transformación. Actualmente la incorporación de equipos a nivel industrial ha crecido significativamente en el mercado mundial (Tabla1).

**Tabla 1.** Crecimiento del número de máquinas de HHP a nivel mundial.  
Recurso: Hiperbaric S.A, (2014)

Tiempo (años)	Máquinas de HHP en industria
1990	2
1991	2
1992	3
1993	3
1994	4
1995	4
1996	4
1997	4
1998	5
1999	9
2000	14
2001	21
2002	27
2003	38
2004	52

2005	68
2006	78
2007	95
2008	109
2009	122
2010	147
2011	167

---

Para conseguir inactivar microorganismos y enzimas se utilizan presiones que varían entre 100-800 MPa (Megapascales) con tiempos relativamente cortos (desde pocos segundos a varios minutos) y en combinación con temperatura moderada entre 20 y 50 °C. Las condiciones de procesado dependen principalmente del alimento a tratar y del microorganismo en cuestión, aunque esta tecnología es todavía ineficaz para destruir esporas bacterianas, ya que estas presentan una extrema resistencia a las altas presiones (Ratphitagsanti et al. 2009; Barbosa-Cánovas et al 1999).

Una parte importante de la implantación de las Altas Presiones Hidrostáticas ha estado relacionada con el desarrollo de envases adecuados. Se puede utilizar una gran variedad de envases para el tratamiento de productos procesados por Altas Presiones Hidrostáticas. Sin embargo, es necesario que los alimentos se envasen al vacío en un envase con material flexible para que la presión se transmita correctamente (Polipropileno (PE), Polietileno Tereftalato (PET), Polipropileno (PP), Etileno y vinil-alcohol (EVOH)). La poliamida (PA) o la cubierta de nylon son los materiales de envasado más utilizados en el procesado por

Altas Presiones Hidrostáticas (Ayvaza et al. 2010; Juliano et al. 2012). Los envases fabricados en cristal, papel o metal no son óptimos para el tratamiento debido a que sus características no permiten la transferencia de presión al alimento. En cuanto al espacio de cabeza, este no debe ser mayor de un 30% tal y como se ha descrito en diversos estudios (Lambert et al. 2000) ya que un porcentaje mayor puede minimizar el efecto de los tratamientos.

### **Inactivación microbiana mediante altas presiones**

El objetivo de cualquier proceso de conservación es la destrucción de los microorganismos que pueden alterar al alimento o producir en el consumidor una enfermedad transmitida por el alimento. Se han llevado a cabo diversos estudios para conocer la naturaleza de la muerte de diversos microorganismos sometidos a Altas Presiones Hidrostáticas. Se ha visto que la sensibilidad de los microorganismos a las HHP varía, siendo los mohos y levaduras los más sensibles, seguidos por las bacterias Gram negativas con una sensibilidad media y, por último, las Gram positivas, con una mayor resistencia (Smelt, 1998). En cuanto al mecanismo de acción, según el estudio realizado por Huang et al. (2014) una presión de 50 MPa puede afectar e inhibir la síntesis de proteínas y producir una reducción del número de ribosomas en el microorganismo. Una presión de 100 MPa puede causar la desnaturalización parcial de las proteínas celulares. Al incrementar la presión a 200 MPa esta produce tantos daños externos en la membrana celular como internos en la estructura microbiana. Presiones iguales o superiores a 300 MPa producen daños irreversibles en el microorganismo, produciendo liberación de componentes intracelulares al medio extracelular, lo que conlleva la muerte del microorganismo.

De igual manera cabe resaltar que los diferentes efectos que ejercen las HHP sobre los microorganismos dependen directamente de la etapa de desarrollo en la que se encuentre, ya que las células en fase logarítmica presentan una mayor sensibilidad al tratamiento por HHP que aquellas en fase estacionaria. Mañas & Mackay (2004) observaron este comportamiento utilizando la cepa J1 de *Escherichia coli* en fase exponencial y estacionaria. Las células en fase estacionaria presentaron una mayor resistencia a los tratamientos por HHP que aquellas que se encontraban en fase exponencial. Se observaron también diversas modificaciones celulares (agregación de proteínas citoplasmáticas o condensación de los nucleótidos) cuando el tratamiento fue de 200 MPa por 8 min a 20 °C. Esto puede deberse a que en la fase logarítmica los microorganismos se encuentran en división celular y por tanto la membrana es más sensible a los factores externos (Ayvaza et al. 2012).

Un factor importante en el procesado por HHP es la temperatura de tratamiento ya que al combinarse estas dos tecnologías incrementan significativamente la inactivación microbiana. Según los estudios llevados a cabo por Chen & Hoover, (2003) y Ross et al. (2003) al realizar un tratamiento por HHP con temperaturas iniciales entre 45 y 50 °C con las cepas patógenas de *Listeria monocytogenes* se logra reducir la carga inicial de microorganismos hasta niveles de inactivación microbiana superiores a 5 ciclos logarítmicos.

Las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) han demostrado ser una tecnología efectiva para la inactivación de diversos patógenos, según lo publicado por Jofré et al. (2009). La aplicación de un tratamiento de 600 MPa durante 6 min a 31 °C produjo una reducción cercana a 3,5 log para *E. coli*, *L. monocytogenes*,



*Salmonella* entérica subsp. entérica, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* en productos cárnicos.

Aunque existen bastantes estudios en relación al efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas sobre bacterias, la información referente a mohos y levaduras es relativamente baja (Tabla 2). En general, las levaduras y mohos pueden inactivarse a presiones de 200 a 400 MPa (Perrier-Cornet et al. 1999), sin embargo al tratarse en algunos casos de esporas o estar en alimentos con elevadas concentraciones de azúcares, la presión necesaria puede incrementarse hasta los 600 MPa (Goh et al. 2007). Estos microorganismos frecuentemente alteran cereales, vegetales mínimamente procesados, derivados lácteos como mantequilla, yogur, queso fresco, entre otros (Evert-Arriagada et al. 2012; Rosaria et al. 2001).

**Tabla 2.** Inactivación por HHP de mohos y levaduras en diferentes alimentos

Alimento	Microorganismo	Condiciones HHP	Resultados Inactivación	Referencia
Zumo de piña	<i>Byssochlamys nivea</i>	550-600 MPa por 3-15 min a 20-80 °C	600 MPa por 15 min a 80 °C, 5,7 log <sub>10</sub> reducción	Da Rocha et al. 2009
Zumo manzana - brócoli	<i>S. cerevisiae</i> <i>A. flavus</i>	250-400 MPa por 5-20 min a 21 °C	400 MPa por 10 min a 21 °C, 5 log <sub>10</sub> reducción	Houška et al. 2006
Zumo manzana	<i>Talaromyces avellaneus</i>	200-600 MPa por 10-60 min a 17-60 °C	600 MPa por 50 min a 60 °C, 5 log <sub>10</sub> reducción ascosporas	Voldřich et al. 2004

Concentrado zumo naranja	<i>S. cerevisiae</i>	100-400 MPa por 0- 120 min a 20 °C	400 MPa por 60 min a 20 °C, 3 log <sub>10</sub> reducción	Basak et al. 2002
Queso	<i>P. roqueforti</i>	50-800 MPa por 20min a 10-30 °C	400 MPa por 20 min a 20 °C, 6 log <sub>10</sub> reducción	O'Reilly et al. 2000

---

Las esporas son unas formas celulares que utilizan algunos microorganismos para sobrevivir a circunstancias adversas y por tanto se caracterizan por ser muy resistentes a los diferentes tratamientos de conservación, entre los géneros más relevantes en alimentos se encuentra *Clostridium*, *Bacillus*, *Alicyclobacillus*. La carga inicial de esporas presentes en los alimentos se puede reducir significativamente utilizando HHP en combinación con temperaturas que pueden ir de moderadas a elevadas (Tabla 3). En varios estudios se han alcanzado hasta 3,5 log<sub>10</sub> reducciones en *Clostridium sporogenes*, 5,7 log<sub>10</sub> reducciones en *Bacillus coagulans* con temperaturas entre 60-90 °C (Zhu et al.2008; Zimmermann et al. 2013). De igual manera Meyer (2000) ha observado reducciones significativas en la concentración inicial de esporas en alimentos de baja acidez utilizando tratamientos entre 700 y 1000 MPa, con una temperatura de producto de al menos 70 °C. Estas condiciones se utilizan con la finalidad de obtener productos estables a temperatura ambiente y en la mayoría de los casos con una mayor calidad que los procesados por el tratamiento térmico tradicional. No obstante, estas condiciones de tratamiento exigen mantener un control muy riguroso durante el proceso.

En la actualidad se están estudiando métodos para la germinación de estas esporas antes de recibir un tratamiento por alta presión. Estos métodos

consisten en combinar el uso de baja presión (150-300 MPa), un germinante y temperatura ambiente con la finalidad de inducir la germinación de la espora, seguido de un tratamiento combinado de HHP y tratamiento térmico (300-900 MPa, 30-60 °C) (Georget et al. 2014; Reineke et al. 2011).

**Tabla 3.** Inactivación por HHP de esporas en diferentes alimentos.

Alimento	Microorganismo	Condiciones HHP	Resultados inactivación	Referencia
Zumo zanahoria	<i>B. licheniformis</i>	400-600 MPa por 0-40min a 40-60 °C	241 a 465 MPa (D values rango 23,3 a 31 °C)	Tola & Ramaswamy, 2014
Pollo cocido	<i>Cl. botulinum</i>	600 MPa por 2 min a 20 °C	600 MPa por 2 min a 20 °C reducción 0,32 log <sub>10</sub>	Linton et al. 2014
Zumo naranja	<i>A. acidoterrestris</i>	200-600 MPa por 1–15 min a 45-65 °C	600 MPa, D <sub>45 °C</sub> = 12.9 min 200 MPa, D <sub>65 °C</sub> = 5 min	Silva et al. 2012
Salsa tomate	<i>B.coagulans</i> <i>A.acidoterrestris</i>	100– 800 MPa por 10 min a 25, 40, 60 °C	700 MPa por 10 min a 60 °C , reducción 2 log <sub>10</sub>	Vercammen et al. 2012
Pulpa de tomate	<i>B. coagulans</i>	300-600 MPa por 0-39 min a 50-60 °C	600 MPa por 15 a 60 °C, reducción 5,7 log <sub>10</sub>	Zimmermann et al. 2013
Leche	<i>Cl. sporogenes</i>	700–900 MPa por 0-32 min a 80–100 °C	900 MPa, D <sub>80 °C</sub> = 9,1 min ZT = 18,2 °C	Ramaswamy et al. 2010

Carne molida	<i>Cl. sporogenes</i>	700-900 MPa por 0-120 min a 80-100 °C	800 MPa por 10 min a 90 °C reducción 3,5 log <sub>10</sub>	Zhu et al. 2008
--------------	-----------------------	---------------------------------------	------------------------------------------------------------	-----------------

---

### **Efecto de las HHP en las proteínas.**

Aunque la tecnología de HHP se ha utilizado fundamentalmente como una tecnología para la producción de alimentos inocuos con características sensoriales y nutricionales superiores a los tratados térmicamente, también se ha visto que pueden aplicarse en otros campos de la alimentación aprovechando los efectos que tiene la tecnología sobre determinados componentes. Uno de los efectos de los tratamientos por Altas Presiones Hidrostáticas es la rotura de los enlaces no covalentes (iónicos, hidrofóbicos, puentes de hidrógeno) de las proteínas; por lo tanto la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria pueden desplegarse y disociarse, mientras la estructura primaria se mantiene sin cambios (Dzwolak et al. 2002). Según Messens et al. (1997) aplicando una presión menor a 150 MPa se observan cambios en la estructura cuaternaria, sin embargo es necesario aplicar más de 200 MPa para modificar significativamente las estructuras secundaria y terciaria. Debido a estos cambios producidos en las proteínas durante los tratamientos por HHP varios autores (Liu et al. 2008; Tabilo-Munizaga et al. 2014) han estudiado el aprovechamiento de esta tecnología para desarrollar diversas aplicaciones industriales que aporten características únicas a los alimentos (formación de geles, emulsiones, espumas, nuevos sabores, texturas) o como remplazo de grasas. Debido a esto se ha profundizado en el estudio de agentes estabilizantes y gelificantes (polisacáridos, proteínas). Estos agentes se incorporan comúnmente a los

productos alimenticios con la finalidad de aportar estabilidad, textura y palatabilidad (Devi et al. 2013; Chronakis & Kasapis, 1995). Cabe resaltar que estos cambios dependen directamente tanto del tipo de proteína utilizada (fuerza iónica, pH) como del tratamiento por HHP (presión, tiempo, temperatura). Todos estos estudios hacen que se esté mirando a las Altas Presiones Hidrostáticas como una tecnología interesante en la revalorización de algunos residuos y subproductos de la agroindustria.

Según He et al. (2014) al tratar proteínas aisladas de cacahuete a presiones entre 50 y 200 MPa durante 5 min estas incrementaron gradualmente la capacidad para retener agua (WHC) y la capacidad para unirse a los aceites (OBC), produciendo cambios de gran interés al modificar propiedades en las proteínas. Por otra parte se ha estudiado en profundidad el efecto de las altas presiones en las proteínas de la leche y el suero bajo diversas condiciones de tratamiento, observándose diversos cambios en las estructuras de las proteínas. Se observan cambios en las micelas de la caseína a presiones entre 150 y 400 MPa y a la temperatura de 20 °C (Ye et al. 2014). También se ha observado una mayor desnaturalización de las proteínas del suero lácteo  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina, a presiones superiores a 100 y 400 MPa, respectivamente, que la producida en la caseína (Messens et al. 1997; Roach & Harte, 2008; Huppertz et al. 2006)

Actualmente se pueden encontrar estudios sobre el efecto de las altas presiones en proteínas de origen vegetal, fundamentalmente aquellas que presentan un alto valor nutritivo y alguna propiedad funcional de interés para la industria alimentaria. Según He et al. (2014), los aislados proteicos provenientes de cacahuete al 5% p/v formaron geles cuando se trataron a 100 MPa durante 5

min a 25 °C y en un estudio de aislados proteicos provenientes de soja la gelificación se produjo utilizando un 9% p/v de proteína con un tratamiento de 600 MPa y entre 5 y 10 min de duración con una temperatura final de 33,5 °C (Speroni & Añón, 2013). Cabe resaltar que para la gelificación de estos aislados fue necesaria la adición de CaCl<sub>2</sub> en concentraciones de 0,015 a 0,020 mol L<sup>-1</sup>, tal como observó Maltais et al. (2005). Estos autores vieron que las concentraciones de calcio son de gran importancia e influían directamente en las características finales de los geles, ya que a bajas concentraciones se generaron geles ordenados o filamentosos, mientras que a concentraciones elevadas se produjeron geles con separación de fases, desordenados o con agregados.

#### **Efecto de las HHP sobre las enzimas.**

Las enzimas son proteínas con un gran poder catalítico y especificidad. Normalmente una enzima puede catalizar una sola reacción química o grupo de reacciones relacionadas. Estas tienen dos regiones importantes: una, encargada de reconocer el sustrato, y la otra es la encargada de catalizar la reacción cuando se ha unido al sustrato. Un mínimo cambio conformacional en la estructura puede variar por completo la funcionalidad de la enzima.

Las enzimas se pueden dividir en dos grupos según el efecto del tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas. En el primer grupo están aquellas enzimas que se activan con presiones entre 100 y 500 MPa. Esta activación se presenta solamente en proteínas monoméricas (Asaka et al.1994; Huang et al. 2013). En el segundo grupo se encuentran aquellas que al ser sometidas a presiones superiores a 500 MPa en combinación con temperaturas relativamente elevadas se inactivan (Igual et al. 2013; Ortuño et al. 2013). Según el estudio realizado por

Hendrickx et al. (1998) el mayor efecto que tienen las HHP sobre las enzimas se basa en el cambio conformacional de la proteína sometida a altas presiones. Las enzimas mantienen su estructura primaria debido a que los tratamientos de presión no alteran los enlaces covalentes de la proteína. Los principales estudios llevados a cabo sobre el efecto de las HHP en las enzimas se basan en aquellas enzimas que se encuentran presentes con mayor frecuencia en los alimentos y producen el deterioro de los mismos o cambios sensoriales no aceptables (Tabla 4). Entre estas enzimas podemos destacar la peroxidasa (POD), Pectinmetilesterasa (PME), lipoxigenasa (LOX), polifenol oxidasa (PPO) (Ludikhuyze et al. 2002). En general la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD) se inactivan al aplicar presiones iguales o superiores a 400 MPa en combinación con temperaturas entre 20 y 90 °C, reduciéndose en la mayoría de casos hasta en un 50% la actividad inicial. Estos porcentajes pueden variar dependiendo de las propiedades intrínsecas de los alimentos procesados.

**Tabla 4.** Inactivación de enzimas por HHP

Alimento	Enzima	Condiciones HHP	Resultados de inactivación	Referencia
Mermelada	Pectinmetilesterasa (PME) Peroxidasa (POD)	550–700 MPa por 45-75 °C a 2,5–75 min	PME: 27–40% POD: 51–70%	Igual et al. 2013
Puré de Feijoa	Peroxidasa (POD) Polifenol oxidasa (PPO) Pectinmetilesterasa (PME)	600 MPa por 5 min a 25 °C	POD: 78% PPO: 55,6% PME: 56%	Ortuño et al. 2013

Fresa camarosa	Polifenol oxidasa (PPO)	600 MPa por 15 min a 34-62 °C	PPO: 82%	Sulaiman & Silva, 2013
Batido de frutas	Polifenol oxidasa (PPO)	600 MPa por 10 min a 20 °C	PPO: 83%	Keenan et al. 2012
Jamón curado	Glutación peroxidasa (GSHPx) Superóxido dismutasa (SOD)	900 MPa por 5 min a 12 °C	GSHPx: 44,2% SOD: 17,6%	Clariana et al., 2012
Pulpa de fresa	$\beta$ -Glucosidasa Polifenol oxidasa (PPO) Peroxidasa (POD)	400-600 MPa 5- 25 min a 25 °C	$\beta$ -Glu: 41,4% PPO: 74,6% POD: 74,6%	Cao et al. 2011

## Aplicaciones de las HHP en procesos industriales

Actualmente las altas presiones se están aplicando para la conservación de diversos alimentos tanto animales como vegetales. En el mercado actual se pueden obtener zumos de frutas (manzana, naranja, fresa, coco) y vegetales (espinacas, zanahoria, apio, tomate) con una elevada calidad tanto nutritiva como sensorial. Igualmente en los últimos años se ha incrementado la utilización de las HHP para el procesado y exportación de productos cárnicos (jamones, embutidos) a países como Japón y Estados Unidos. En cuanto a productos lácteos, se está procesando mediante presurización calostro, yogurt y salsas con base láctea.

Una de las aplicaciones de las HHP que presentan un gran atractivo es la estabilización de queso fresco y la revalorización de residuos de queserías. El queso fresco pertenece al grupo de alimentos listos para su consumo (LPC) y

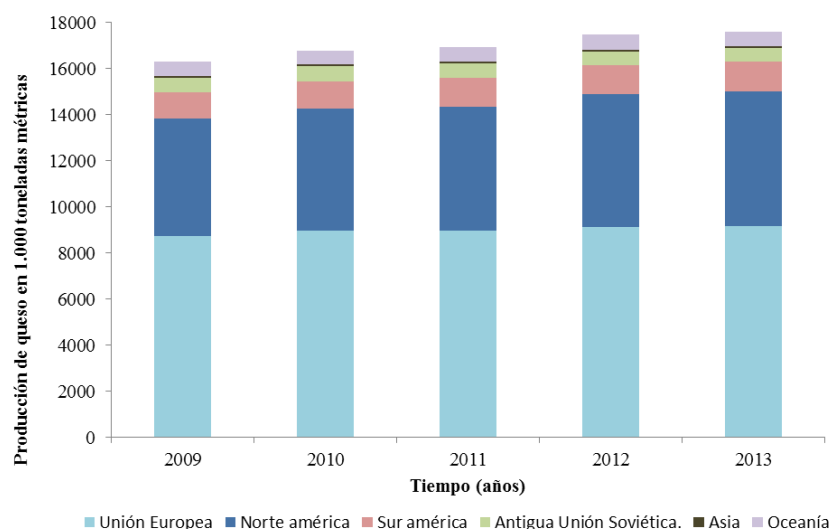


con una producción importante (Figura 1). Este producto se caracteriza por presentar propiedades fisicoquímicas especiales como un pH cercano a la neutralidad, una actividad de agua elevada 0,97, humedad relativa alta, es muy propenso a la contaminación de microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 (Kousta et al. 2010; Rosengrena et al. 2010) y alteradores como mohos y levaduras, que producen cambios durante el almacenamiento del producto en refrigeración como: generación de sabores extraños, producción de gas, decoloración y cambios en la textura. Aunque actualmente el queso fresco se manufactura a partir de leche pasteurizada (Devi et al. 2013), es relativamente frecuente la recontaminación durante las fases de fabricación, manipulación posterior y envasado (Reij et al.2004). Es por esto que la tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas puede ser de gran interés en la estabilización microbiológica de este producto, evitando las elevadas pérdidas anuales producidas por enfermedades de origen alimentario en las que los quesos frescos se ven envueltos y rechazos por alteración.

En este punto es preciso considerar que la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en su estrategia de 2012 para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS) pretende sensibilizar a la población sobre la obesidad y las enfermedades relacionadas con el consumo elevado de productos con elevado contenido de sal. Según Mathers & Loncar en su trabajo "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030" publicado en 2006, se estima que para el año 2030 el número de fallecimientos por enfermedades cardiovasculares relacionadas con el consumo excesivo de sal sea de 23.3 millones de personas,

convirtiéndose en la principal causa de muerte a nivel mundial, por delante del consumo de tabaco. En cuanto a la ingesta diaria la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe sobre la prevención de enfermedades crónicas de 2003 recomienda un consumo máximo de 5g de sal (cloruro de sodio (NaCl)) al día. En cuanto a la situación de consumo de sal en España en un trabajo realizado por Ortega et al. (2011) junto con la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), en una población entre 18-60 años, la ingesta de sal como cloruro sódico se estimó en 9,8 g/día. Igualmente se pudo concluir que el 88,2% de la población presenta un exceso de cloruro sódico en su dieta, sobrepasando por tanto las recomendaciones realizadas por la OMS. Teniendo en cuenta esta consideración, conviene evaluar si la disminución en NaCl puede tener un efecto adverso en la eficacia del tratamiento por alta presión en queso fresco.

**Figura 1.** Producción de queso en determinados países y/o continente. 1.000 Métricas Toneladas Recurso: USDA, 2014



## **Epidemiología del queso fresco**

En Latinoamérica, y en especial en Colombia, que los quesos representan un vehículo importante de agentes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) es incuestionable. Según la información epidemiológica nacional de los brotes de ETA registrados que han tenido seguimiento desde el Instituto Nacional de Salud (INS), según tamaño de población involucrada y donde el alimento implicado fue el queso, se puede observar según los últimos datos publicados en el 2012 que se reportaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública-SIVIGILA un total de 11.836 casos, de los cuales en 176 casos el queso se encontró involucrado y los sitios en donde se presentaron fueron hogares, restaurantes, escuelas, regimientos militares. En los brotes con seguimiento se observa que la identificación de agentes sigue siendo deficiente (SIVIGILA, 2012) ya que en muchos de los casos no se reportan directamente a las bases de recolección de datos.

En Colombia, en el periodo comprendido entre 2003 y 2006 se analizaron, en 22 de las 32 entidades territoriales de salud, un total de 40.733 muestras de alimentos procesados, de las cuales 14.919 (36,9%) fueron productos lácteos. Del total de rechazos (2.378), estafilococo coagulasa positivo (ECP) fue la mayor causa con 1.725 muestras (73%). En los productos lácteos, el queso fresco fue el que presentó una mayor tasa de rechazo. De las 3.800 muestras evaluadas por los diferentes centros de control, el queso fresco analizado durante este periodo presentó una tasa elevada de rechazo del 27,7% (1.052). Del total de estas muestras analizadas, 1.049 muestras no se aceptaron por patógenos aislados, siendo en un 92,7% por ECP (973). En cuanto al rechazo por

*L.monocytogenes*, fue de un 6,4% (67) y en menor proporción *Salmonella* spp. 0,9% (9).

En un estudio retrospectivo realizado por el Laboratorio de Salud Pública (LSP), de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá (SDS), durante el periodo de junio de 2000 a junio de 2001 acerca del porcentaje de muestras declaradas no aceptables por presencia de ECP y su relación con la alteración en las características fisicoquímicas de los alimentos, se encontraron 26 muestras positivas, que correspondieron al 21,15% del total recibido. Las muestras objeto de estudio ingresaron por los programas de vigilancia rutinaria (54%), brotes de ETA (31%) y notificación comunitaria (14%). Se observó que los grupos de alimentos más afectados fueron los derivados lácteos (46%) y las carnes de especies mayores (15%). De los casos notificados como ETA se observó que el 32,7% tenían entre las causas de no aceptabilidad la presencia de ECP y/o ES. También se determinó que no existe relación con las alteraciones físicas o químicas en los alimentos que presentaron como causa de no aceptabilidad microbiológica el ECP.

Así mismo es importante señalar que en Colombia, las entidades gubernamentales encargadas de hacer vigilancia epidemiológica no reportan la caracterización toxigénica de las cepas *S. aureus* relacionadas con casos o brotes de intoxicación, debido a que los protocolos exigidos solo incluyen recuento. Adicionalmente en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica, las unidades primarias generadoras de datos (UPGD), que según la normatividad actual son las entidades públicas o privadas que captan la ocurrencia de eventos de interés en salud pública y genera información útil y necesaria para el SIVIGILA, pueden en algunas oportunidades notificar los casos probables de

ETA, que debe ser confirmada epidemiológicamente, como casos de enfermedad diarreica aguda EDA (INS, 2015). Esta situación contribuye al subregistro y a la falta de notificación de los casos y brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE). Otro aspecto a considerar es la falta de conocimiento sobre la vigilancia y la importancia de las ETA en nuestro medio, tanto a nivel del personal asistencial como de los consumidores que acuden poco al servicio médico, en caso de estar enfermos por esta causa (INS, 2015). Todo lo anterior influye en la calidad de los datos epidemiológicos disponibles, suficientes y confiables sobre casos y/o brotes de IAE en la población colombiana.

La ocurrencia de IAE apenas se registra, por consiguiente su importancia está subestimada (Stewart *et al.*, 2001). Pero los brotes donde el queso fresco está involucrado tiene a *S. aureus* como agente etiológico frecuente. El comportamiento del microorganismo en los quesos reviste interés debido a la frecuencia con la que participan en incidentes de IAE. Aproximadamente 25 de los mayores brotes en Estados Unidos de América son causados anualmente por este microorganismo (Holmberg & Blake, 1984). También se estima que el consumo de alimentos contaminados con esta bacteria es el responsable de 185.060 enfermedades, 1.753 hospitalizaciones y 2 muertes por año en este país (Mead *et al.*, 1999). En el periodo 1973-1987 en EUA se registraron 367 brotes con 17.248 casos (Bean & Griffin, 1990). En todos los brotes o intoxicaciones se reconoce que uno de los principales factores que puede ayudar al crecimiento microbiano es la inadecuada temperatura de almacenamiento del alimento preparado previo a su consumo (Marklinder *et al.* 2004). En la Tabla 5 se presenta el número de brotes de *S. aureus* y *L. monocytogenes* del total

reportado en USA, en el periodo comprendido entre los años 1998 y 2014 estos datos fueron reportados por el "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC, 2015) en su apartado Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Para el caso de *S. aureus* se presentaron 9.516 enfermos, 475 hospitalizaciones y 4 muertes. De la totalidad de los brotes se relacionaron 6 de estos con el consumo directo de queso fresco. Si bien el número de brotes en *L.monocytogenes* es inferior (58) en comparación con *S. aureus* -se pudo relacionar de manera directa el queso fresco o derivados en 6 de estos brotes-, es conveniente destacar que este microorganismo presenta un mayor número de muertes (116) durante el periodo de evaluación 1998-2014.

**Tabla 5.** Brotes presentados en Estados Unidos durante el periodo 1998-2014, para *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Recurso: CDC- FOOD Tool, 2015

<b>Año</b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>L. monocytogenes</i></b>
1998	40	2
1999	60	5
2000	68	2
2001	80	2
2002	82	1
2003	58	2
2004	43	-
2005	41	4
2006	30	4
2007	25	1
2008	17	3
2009	15	3
2010	11	5
2011	13	5
2012	9	4

2013	19	6
2014	19	9
<b>Total</b>	<b>630</b>	<b>58</b>

En la Unión Europea existe una larga tradición de producción y consumo de quesos elaborados a partir de leche cruda. Para poder continuar esta tradición y a la vez garantizar la inocuidad alimentaria se han realizado importantes mejoras en el sistema de producción, recolección y almacenamiento de la leche cruda utilizada para la producción de quesos. A pesar de ello, entre el 1 y 9% de todos los brotes de *S. aureus* reportados en Europa entre 1993 y 1999 estuvieron asociados a leche y derivados lácteos (López-Pedemonte *et al.*, 2007). En países como Francia, Escocia e Inglaterra se destacan incidentes (a veces con más de 100 víctimas) que resultan del consumo de quesos elaborados con leche no pasteurizada donde el agente patógeno responsable identificado fue *S. aureus* (Fernández-Escartín, 2000). En el Reino Unido el número de casos reportados desde 1980 no ha sido superior a 189 por año, aunque se estima que es solamente un pequeño porcentaje de los casos anuales (Sutherland & Varnam, 2002).

En cuanto a los productos más asociados a las ETA se observa que los quesos contaminados a partir de leche cruda o higienizada han sido responsables de focos de intoxicaciones alimentarias provocadas por varios tipos de bacterias, tales como *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* verotoxigénica y ESs (UE, 2004). Los incidentes por *S. aureus* en dichos países con frecuencia se gestan en las plantas procesadoras, siendo el problema principal la contaminación de los cultivos iniciadores o su mal funcionamiento.

Igualmente se recomienda que en todas las plantas de procesos de lácteos se sigan sistemas de control de calidad que garanticen una correcta elaboración de alimentos inocuos (ICMSF, 1998; Castillo, 2004).

En estudios adelantados en quesos típicos producidos artesanalmente como el Mihalic típico de Turquía (Cokal et al. 2012) se encontró que la prevalencia de microorganismo patógenos es elevada, ya que de un total de 200 muestras analizadas en el estudio el 100% presentó *S. aureus* en una concentración media de 2,69 log<sub>10</sub> UFC/g. En cuanto a *L. monocytogenes* la prevalencia fue relativamente baja, solo 5 muestras de un total de 100 muestra de quesos Mihalic fueron positivas. Lo anterior se debe principalmente al uso de leche cruda, un proceso rudimentario que presenta bajos controles en condiciones higiénicas.

En América Latina se producen y comercializan varios tipos de quesos frescos sin una correcta protección a factores externos, lo que conlleva a una exposición directa a la contaminación humana y ambiental. De igual manera se presenta un frecuente abuso de la temperatura durante el almacenamiento y comercialización. En México no se tienen definidos los antecedentes de los productos incriminados; aparentemente se trata de quesos frescos no pasteurizados o contaminados por las personas que los elaboran. En la fabricación de los quesos frescos (sobre todo los de origen artesanal), la leche y el producto se manejan por periodos considerablemente largos, de hasta 48 horas, a temperatura ambiente (Fernández -Escartín, 2000).

### **Gestión de residuos de la industria quesera**

Durante los últimos años ha crecido la preocupación acerca de cómo gestionar los residuos de las industrias agroalimentarias. Los gobiernos a nivel mundial



están incentivando con proyectos y recursos económicos la investigación en la manipulación y reutilización de subproductos provenientes de las industrias en general, y lácteas en particular, especialmente aquellas que producen quesos. Este alimento al ser procesado en las diversas plantas de producción genera grandes volúmenes de suero que representan una fuente de contaminación para el medio ambiente debido principalmente a su alto contenido en lactosa y proteínas ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbúmina, albúmina sérica) que son un sustrato ideal para la proliferación microbiana tanto de patógenos como alteradores (Prazeres et al. 2012, Carvalho et al. 2013). Su mala gestión como residuo trae asociado un alto impacto medioambiental, generando efluentes líquidos que tienen una rápida tendencia a la fermentación lo que hace que los tratamientos sean aún más complejos (Prazeres et al. 2012). Este proceso de biodegradación es directamente proporcional a la cantidad de leche o suero que se genera como subproducto, por lo que su control y aprovechamiento es el primer paso para mejorar la calidad medioambiental (FEPALE, 2008). De acuerdo con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina y su informe “Características generales sobre el uso del suero de queso en la Provincia de Santa Fe”, una industria quesera que produce diariamente 400.000 litros de suero sin depurar estaría produciendo una contaminación diaria similar a una población de 1.250.000 habitantes.

En Colombia el lactosuero se utiliza en un porcentaje mínimo para la alimentación animal y en la mayoría de los casos este subproducto generado de la producción del queso se vierte directamente en los desagües municipales, donde supone un gran impacto medio ambiental. Se estima que un 59% de los productores no cuentan con tratamientos adecuados para el tratamiento del

suero lácteo (Castillo & Pichimata, 2008). En la actualidad se han propuesto diversos tratamientos de valorización tales como generación de bebidas fermentadas, producción de ácidos orgánicos (láctico, cítrico), producción de enzimas con interés industrial. En cuanto a la calidad microbiológica del suero producido es muy común encontrar microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp.) que provienen tanto de las materias primas como de los procesos productivos. Por tal motivo es sumamente importante y requiere un abordaje inmediato el problema de los residuos de las industrias queseras y estudiar las posibilidades de utilización y valorización del suero lácteo obteniendo productos inocuos y con un alto valor biológico destinados a suplir diversas deficiencias nutricionales.

En Estados Unidos el 50% del total de la producción se está utilizando para repostería, alimentos infantiles, suplementos alimenticios para deportistas, helados al igual que para industria farmacéutica, por tal motivo se ha estudiado la utilización de tratamientos no térmicos como las Altas Presiones Hidrostáticas, ya que pueden proporcionar un valor añadido a estos productos y subproductos lácteos. En relación con el uso de esta tecnología varios autores han indicado la efectividad de las HHP para reducir e incrementar la vida útil de productos como leche, queso, yogurt. Estos tratamientos por presurización modifican en gran medida el comportamiento de las proteínas del suero ( $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina) generando modificaciones en la retención de agua lo que afecta directamente a las texturas obtenidas bajo las diversas combinaciones de Presión-tiempo.

En conclusión se puede decir que el tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas ha demostrado ser una tecnología efectiva para inhibir el desarrollo

de microorganismos patógenos y alteradores sin alterar en gran medida la calidad inicial de los alimentos. De igual forma un tratamiento combinado de HHP y temperatura moderada ha demostrado tener un gran potencial tanto para la inactivación de microorganismos y enzimas, como para el desarrollo de nuevos productos debido a la modificación de proteínas de origen animal o vegetal. Sin embargo, cabe destacar que al aplicar las HHP se deben considerar diversos parámetros como tiempo, presión, temperatura, pH, ya que estos parámetros determinarán los intervalos óptimos de presión para la inactivación microbiana

En la bibliografía actual no hay datos suficientes sobre el efecto de las HHP al variar las concentraciones de cloruro sódico, sobre todo respecto a cómo se pueden ver afectadas o favorecidas la inactivación microbiana o las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de algunos derivados lácteos tratados por esta tecnología no térmica.

## REFERENCIAS

Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) (2015). Contenido de sal en los alimentos en España. 2012. Estrategia NAOS. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid. [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/sal\\_alimentos.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/sal_alimentos.pdf). (Accessed on: 12 April 2015).

Asaka, M.; Aoyama, Y.; Ritsuko, N.; Hayashi, R. Purification of a Latent Form of Polyphenoloxidase from La France Pear Fruit and its Pressure-activation in Biosci. Biotech. Biochem 1994, 58, 1486-1489.

Ayvaza, H.; Schirmerb, S.; Parulekarc, Y.; Balasubramaniama, V.M.; Somervillea, J. A.; Daryaeia, H. Influence of selected packaging materials on some quality aspects of pressure-assisted thermally processed carrots during storage. LWT - Food Science and Technology 2012, 46, 437-447.

Barbosa-Cánovas, G. V.; Gongora-Nieto, M. M.; Pothakamury, U. R.; Swanson, B. G. Fundamentals of high-intensity pulsed electric fields (PEF). In "Preservation of foods with

pulsed electric fields". G. V. Barbosa-Cánovas et al. edited. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1999, pp. 1-19, 76-107, 108-155.

Basak, S.; Ramaswamy, H.S.; Piette, J.P.G. High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2002, 3, 223-231.

Bean, N. H.; Griffin, P. M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *Journal of Food Protection* 1990, 53(9), 804-817.

Cao, X.; Zhang, Y.; Zhang, F.; Wang, Y.; Yi, J.; Liao, X. Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011, 91(5), 877-885.

Carvalho, F.; Prazeres, A. R.; Rivas, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the total Environment* 2013, 445, 385-396.

Castillo, A. Calidad e inocuidad en plantas lecheras. Animal Science Department. Faculty of Food Science and Technology. Texas. University College Station TX 2004, 77843-2471.

Castillo, L.C.; Pichimata, P.A. Caracterización de la industria quesera de la región del Valle de Ubaté y Chiquinquirá, Universidad de la Salle, 2009, Bogotá, Colombia.

Centers for Disease Control and Prevention, Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool) (CDC, 2015)

Chawla, R.; Patil, G. R.; Singh, A. K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *Journal of food science and technology* 2011 48(3), 260-268.

Chen, H.; Hoover, D. G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2003, 4(1), 25-34.

Chevalier, D.; Le Bail, A.; Ghoul, M. Effects of high pressure treatment (100–200 MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle. *Food Research International*, 2001, 34, 425-429.

Chronakis, L.S.; Kasapis, S. A rheological study on the application of carbohydrate–protein incompatibility to the development of low fat commercial spreads *Carbohydrate Polymers*, 1995, 4, 367-373

Clariana, M.; Guerrero, L.; Sárraga, C.; Garcia-Regueiro J. A. Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. *Meat Science* 2012, 90, 323-329.

Cokal, Y.; Dagdelen, A.; Cenet, O.; Gunsen, U. Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. *Food Control* 2012, 26(2), 337-340.

Da Rocha Ferreira, E. H.; Rosenthal, A.; Calado, V.; Saraiva, J.; Mendo, S. (2009). *Byssochlamys nivea* inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. *Journal of food engineering*, 95(4), 664-669.

Devi, A.F.; Buckow, R.; Hemar, Y.; Kasapis, S. Structuring dairy systems through high pressure processing. *Journal of Food Engineering* 2013, 114 (1), 106-122.

Devi, A.F.; Liu, L.H.; Hemar, Y.; Buckow, R.; Kasapis, S. Effect of high pressure processing on rheological and structural properties of milk–gelatin mixtures. *Food Chemistry* 2013, 141, 1328-1334.

Dzwolak, W.; Kato, M.; Taniguchi, Y. Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on proteins. *Biophysica Acta*, 2002, 1595, 131-144.

Evert-Arriagada, K.; Hernández-Herrero, M.M.; Juan, B.; Guamis, B.; Trujillo A.J. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering* 2012, 110, 248-253.

FEPALE Federación Panamericana de Lechería (2008) “Gestión Ambiental y Aguas residuales en Industrias Lácteas.

Fernández- Escartín, E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Editorial Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Georget, E.; Kapoor, S.; Winter, R.; Reineke, K.; Songa, Y.; Callananc, M.; Anantac, E.; Heinz, V.; Mathys, A. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure. *Food Microbiology* 2014, 41, 8-18.

Goh, E.L.C.; Hocking, A.D.; Stewart, C.M.; Buckle, K.A.; Fleet, G. H. Baroprotective effect of increased solute concentrations on yeast and moulds during high pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2007, 8, 535-542.

He, X.H.; Liu, H.Z.; Liu, Li.; Zhao, G.L.; Wang, Q. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. *Food Hydrocolloids* 2014, 36, 123-129.

Hendrickx, M. E.; Ludikhuyze, L. R.; van den Broeck, I.; Weemaes, C. A. Effects of high-pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology* 1998, 9, 197–203.

Hiperbaric S.A. Available online: <http://www.hiperbaric.com/es>. (Accessed on: 20 March 2014)

Holmberg, S. D.; Blake, P. A. Staphylococcal food poisoning in the United States: new facts and old misconceptions. *Jama* 1984, 251(4), 487-489.

Houška, M.; Strohalm, J.; Kocurová, K.; Totušek, J.; Lefnerová, D.; Tříška, J. High pressure and foods— Fruit/vegetable juices. *Journal of Food Engineering* 2006, 77(3), 386-398.

Huang H.W.; Lung, H.M.; Yang, B. B.; Wang, C.Y. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control* 2014, 40, 250-259.

Huang, W.; Bi, X.; Zhang, X.; Liao, X.; Hu, X.; Wu, J. Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2013, 18, 74-82.

Huppertz, T.; Fox, P.F.; Kruif, K.G. D.; Kelly, A.L. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: a review. *Biochimica Et Biophysica Acta-proteins and Proteomics*, 2006, 1764 (3), 593-598.

Igual, M.; Sampedro, F.; Martínez-Navarrete, N.; Fanc, X. Combined osmodehydration and high pressure processing on the enzyme stability and antioxidant capacity of a grapefruit jam. *Journal of Food Engineering* 2013, 114, 514-521.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1996). *Staphylococcus aureus*. In: Roberts, T.A., et al. (Eds.) *Microorganisms in Foods 5: Microbiological specification of food pathogens*. pp. 299-333. London, UK: Blackie Academic & Professional. ISBN 0 412 47350 X.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1998). *Milk and dairy products, XI Cheese*. In: Roberts, T.A., et al. (Eds.) *Microorganisms in*

foods; Microbial ecology of food commodities. pp. 549-558. London: Blackie Academic and professional. ISBN 0-7514-0430-6.

Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) (2015). Boletín epidemiológico. <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx> (Accessed on: 17 March 2014).

Jofré, A.; Aymerich, T.; Grébol, N.; Garriga, M. Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne organisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT-Food Science and Technology* 2009, 42, 924-928.

Juliano, P.; Koutchma, T.; Sui, Q.A.; Barbosa-Canovas, G.V.; Sadler, G. Polymeric-based food packaging for high-pressure processing. *Food Engineering Reviews* 2010, 2(4), 274-297.

Keenan, D. F.; Rößle, C.; Gormley, R.; Butler F.; Brunton N. P. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology* 2012 45, 50-57.

Kousta, M.; Mataragas, M.; Skandamis, P.; Drosinos, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 2010, 21, 805-815.

Lambert, Y.; Demazeau, G.; Largeteau, A.; Bouvier, J.M.; Laborde-Croubit, S.; Cabannes, M. (2000) New packaging solutions for high pressure treatments of food. *High Press Res* 2000, 19, 597-602.

Linton, M.; Connolly, M.; Houston, L.; Patterson, M. F. The control of *Clostridium botulinum* during extended storage of pressure-treated, cooked chicken. *Food Control* 2014, 37, 104-108.

Liu, R.; Zhao, S.M.; Xiong, S.B.; Xie, B.J.; Qinc, L.H. Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values. *Meat Science* 2008, 80, 632-639.

López-Pedemonte, T.; Roig-Sagués, A. X.; De Lamo, S.; Gervilla, R.; Guamis, B. High hydrostatic pressure treatment applied to model cheeses made from cow's milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 2007, 18(5), 441-447.

Ludikhuyze, L.; van den Broeck, I.; Indrawati; Hendrickx, M.E. High pressure processing of fruits and vegetables. In: *Fruits and Vegetable processing: Improving quality*. Ed. W. Jongen CRC Press, Inc. New York, NY, USA, 2002; pp.346- 362.

Maltais, A.; Remondetto, G. E.; Gonzalez, R.; Subirade, M. Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and Salt effects. *Journal of Food Science* 2005, 70, 67-73.

Mañas, P. & Mackey, B. M. Morphological and Physiological Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in Exponential- and Stationary-Phase Cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. *Applied and environmental microbiology* 2004, 70, 1545-1554.

Marklinder, I. M.; Lindblad, M.; Eriksson, L. M.; Finnson, A. M.; Lindqvist, R. Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated foods in Sweden. *Journal of Food Protection* 2004, 67(11), 2570-2577.

Mathers, C.D.; Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006, 3(11): e442. doi:10.1371/journal.pmed.0030442.

Mead, P. S.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L. F.; Bresee, J. S.; Shapiro, C.; Tauxe, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases* 1999, 5(5), 607.

Messens, W.; Van Camp, J.; Huyghebaert, A. The use of high pressure to modify the functionality. *Trends in Food Science & Technology* 1997, 81, 107-112.

Meyer, R.S. Ultra high pressure, high temperature food preservation process. U.S. patent 2000, 6,017,572.

O'Reilly, C.E.; O'Connor, P.M.; Kelly, A.L.; Beresford, T.P.; Murphy, P.M. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66, 4890-4896.

Ortega, R.M.; Lopez-Sobaler, A.M.; Ballesteros, J.M. et al. Estimation of salt intake by 24 h urinary sodium excretion in a representative sample of Spanish adults. *Br J Nutr* 2011, 105(5), 787-794.

Ortuño, C.; Duongb, T.; Balabanb, M.; Benedito, J. Combined high hydrostatic pressure and carbon dioxide inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase and peroxidase in feijoa puree. *The Journal of Supercritical Fluids* 2013, 82, 56-62.

Perrier-Cornet, J.M.; Hayert, M.; Gervais, P. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 87, 1-7.



Polydera, A.C.; Stoforos N.G.; Taoukis, P.S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 2003, 60, 21-29.

Prazeres, A. R.; Carvalho, F.; Rivas, J. Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management* 2012, 110, 48-68.

Ramaswamy, H. S.; Shao, Y.; Zhu, S. High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 spores in milk at elevated quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering* 2010, 96, 249–257.

Ratphitagsanti, W.; Ahn, J.; Balasubramaniam, V.M.; Yousef, A.E. Influence of pressurization rate and pressure pulsing on the inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores during pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(4), 775-782.

Reij, M. W.; Den Aantrekker, E. D. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 91, 1-11.

Reineke, K.; Mathys, A.; Knorr, D. The Impact of High Pressure and Temperature on Bacterial Spores: Inactivation mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 MPa. *Journal of Food Science*, 2011, 76 (3), 189-197.

Roach, A.; Harte, F. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9 (1), 1-8.

Rosaria Corbo, M.; Lanciotti, R.; Albenzio, M.; Sinigaglia, M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 69, 147-152.

Rosengrena, Å.; Fabricius, A.; Guss, B.; Sylvén, S.; Lindqvist, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology* 2010, 144, 263-269.

Ross, A. I.V.; Griffiths, M.W.; Mittal, G.S.; Deeth, H.C. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 89, 125-138.

Silva, F.V.M.; Tan, E. K.; Farid, M. Bacterial spore inactivation at 45-65 °C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. Food Microbiology 2012, 32, 206-211.

Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) (2012). Boletín epidemiológico anual. <http://portalsivigila.ins.gov.co/sivigila/index.php> (Accessed on: 02 December 2015)

Smelt, J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends in Food Science and Technology, 1998, 9, 152-158.

Speroni, F.; Añón, M.C. Cold-set gelation of high pressure-treated soybean proteins. Food Hydrocolloids 2013, 33, 85-91.

Stewart, C. M.; Cole, M. B.; Legan, J. D.; Slade, L.; Vandeven, M. H.; Schaffner, D. W. Modeling the growth boundary of *Staphylococcus aureus* for risk assessment purposes. Journal of Food Protection 2001, 64(1), 51-57.

Sulaiman, A.; Silva F.V.M. High pressure processing, thermal processing and freezing of 'Camarosa' strawberry for the inactivation of polyphenoloxidase and control of browning. Food Control 2013, 33, 424-428.

Sutherland, J.; Varnam, A. Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Foodborne pathogens 2002, 384-415.

Tabilo-Munizaga, G; Gordona, T.A.; Villalobos-Carvajal, R.; Moreno-Osorio, L.; Salazar, F. N.; Pérez-Wond, M.; Acuña, S. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon Blanc wine. Food Chemistry 2014, 155, 214-220.

Tola, Y.B.; Ramasswamy, H.S. Combined Effects of High Pressure, Moderate Heat and pH on the Inactivation Kinetics of *Bacillus licheniformis* Spores in Carrot Juice. Food Research International 2014, doi: 10.1016/j.foodres. 2014, 02.006.

United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service (FAS). <http://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade> (Accessed on: 20 March 2014)

Vercammen, A.; Vivijs, B.; Lurquin, I.; Michiels, C. W. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic

pressure treatment in buffer and tomato sauce. *International Journal of Food Microbiology* 2012, 152, 162-167.

Voldřich, M.; Dobiáš, J.; Tichá, L.; Čeřovský, M.; Krátká, J. Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *Journal of Food Engineering*, 2004, 61(4), 541-543.

WHO World Health Organization (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of the joint WHO/FAO expert consultation WHO Technical Report Series, No. 916 (TRS 916).

WHO World Health Organization (2013). Mapping salt reduction initiatives in the WHO European Region. WHO Regional Office for Europe. Copenhagen, Denmark. <http://www.who.cz/attachments/article/91/Mapping-salt-reduction-initiatives-in-the-WHO-European-Region-final.pdf> (accessed September 6, 2015).

Ye, R.; Harte, F. High pressure homogenization to improve the stability of casein–hydroxypropyl cellulose aqueous systems Original Research Article *Food Hydrocolloids* 2014, 35,670-677.

Zhu, S.; Naima, F.; Marcotte M.; Ramaswamy, H.; Shao, Y. High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* spores in ground beef at elevated temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 2008, 126, 86-92.

Zimmermann, M.; Schaffner, D. W.; Aragão G.M.F. Modeling the inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature. *LWT - Food Science and Technology* 2013, 53, 107-112.

# **JUSTIFICACIÓN**

Dada la importancia del queso fresco en algunos países y su contribución a los casos de enfermedades transmitidas por alimentos y las enormes pérdidas económicas que se producen por rechazos de producto no conforme, se buscan nuevas formas de estabilización microbiológica de estos productos de forma que se reduzcan los problemas de alteración y los relacionados con la salud del consumidor sin que se alteren sus características nutritivas ni sensoriales. De igual manera es necesario avanzar hacia una producción sostenible minimizando el impacto que presenta la producción quesera sobre el medio ambiente, ya que esta genera residuos contaminantes como el lactosuero, que en la mayoría de los casos se desecha directamente.

Puesto que la información respecto al efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas sobre microorganismos alteradores (*Penicillium aurantiogriseum*, *Rhodotorula glutinis*, *Pseudomonas fluorescens*) y patógenos (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) en queso fresco y lactosuero es actualmente escasa, la presente tesis supondría un avance cualitativo y cuantitativo en esta área. Así mismo, la selección y aplicación de modelos matemáticos predictivos adecuados que ayuden a establecer la vida útil del queso fresco y de los derivados de lactosuero es una aportación importante para esta industria.

Respecto a la valorización del lactosuero como residuo industrial, tampoco existen múltiples estudios con altas presiones en los que se procede al desarrollo de nuevos productos de interés industrial y comercial (geles, bebidas o formulados), por lo que los estudios encaminados en este sentido son de indudable interés científico tecnológico.



# **OBJETIVOS**

El objetivo general de la tesis doctoral es estudiar el efecto de los tratamientos de Altas Presiones Hidrostáticas sobre la calidad del queso fresco y las proteínas de suero de queserías. Este objetivo se pretende alcanzar mediante el desarrollo de los siguientes objetivos particulares:

1. Estudiar el efecto del contenido de cloruro sódico sobre la efectividad de los tratamientos de HHP.
2. Estudiar el efecto de las altas presiones sobre microorganismos alteradores del queso fresco.
3. Estudiar el efecto de las altas presiones sobre microorganismos patógenos de queso fresco.
4. Estudiar el efecto de las altas presiones sobre la calidad del queso fresco.
5. Estudiar la posible aplicación de las altas presiones en la revalorización de lactosuero procedente de queserías.





# CAPÍTULO I

## **Efecto del cloruro sódico en la inactivación de levaduras y mohos por Altas Presiones Hidrostática**

Torres, E.F<sup>a</sup>., González-M, G<sup>b</sup>.& Martínez, A<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos  
Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico  
46980 Paterna (Valencia)  
Spain.

<sup>b</sup> Alpina Research Institute (IAI), Alpina Productos Alimenticios S.A  
Edificio Corporativo Km 3 vía  
251001 Briceño-Sopó (Cundinamarca)  
Colombia.

Torres, E.F., González-M, G. and Martínez, A. Effect of sodium chloride on microbial inactivation by high pressure. Edition:  
1, Publisher: LAP LAMBERT Academic Publishing, ISBN: 978-3-659-68483-8.

## RESUMEN

Las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) son una de las tecnologías para el procesamiento de alimentos más desarrolladas comercialmente aparte del uso del calor. Esta se ha caracterizado por lograr niveles de inactivación microbiana y enzimática cercanos a los procesos de pasteurización, preservando en gran medida las propiedades sensoriales y nutricionales de los productos procesados. Para lograr estos niveles de inactivación se utilizan intervalos de presión entre 100 y 800 MPa (Megapascales) con tiempos de tratamiento cortos (del orden de segundos a varios minutos), combinados con temperaturas moderadas entre 20 y 50 °C. En el presente estudio se trabajó con la levadura *Rhodotorula glutinis* y el moho filamentoso *Penicillium aurantiogriseum*, microorganismos alteradores responsables de la alteración de la calidad en el queso fresco reduciendo su vida útil. Los niveles de presión utilizados fueron 200, 300, 350 y 400 MPa y tiempos desde 1 a 15 minutos a una temperatura inicial de 20 °C

Los resultados obtenidos demuestran que los dos microorganismos estudiados, *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum*, son sensibles a la aplicación de tratamientos por HHP. En cuanto al efecto de la concentración de NaCl en el tratamiento con HHP no se observaron diferencias significativas en los niveles de inactivación alcanzados por HHP para cada una de las concentraciones estudiadas (0; 0,1; 0,5; 0,8%). Sin embargo, con respecto al efecto del sustrato se observaron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para el sustrato de referencia (agua de peptona) y la matriz compleja (queso fresco). En este caso fue en el queso fresco donde se obtuvo una menor reducción en la carga inicial inoculada en comparación con los resultados obtenidos en el medio de

referencia. Los resultados experimentales se ajustaron a la función de distribución de Weibull y se observaron caídas significativas en la carga microbiana a tiempos cortos, sin embargo un aumento del tiempo de tratamiento produjo colas en las gráficas de ajuste.

## **INTRODUCCIÓN**

Actualmente los consumidores buscan calidad y seguridad en los alimentos que adquieren. Para satisfacer estas demandas la industria agroalimentaria ha mejorado sus procesos de conservación por calor, tales como los tratamientos continuos a Alta Temperatura Corto Tiempo (HTST) y Ultra Alta Temperatura (UHT) unido al envasado aséptico (Deeth & Griffiths, 2010; Singh et al. 2009; Sopelana et al. 2013). A pesar de estas mejoras los productos alimenticios siguen presentando pérdidas en su calidad final.

En los últimos años la demanda de productos con procesado mínimo ha ido creciendo por la percepción del consumidor de que mantienen en gran medida las características de seguridad, nutricionales y de sabor, todo esto con una vida útil de almacenamiento razonablemente larga (Chevalier et al. 2001). Este nuevo consumidor ha influido en el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías y conceptos de conservación más respetuosos con las características sensoriales y nutricionales de los alimentos, apareciendo nuevas tecnologías encaminadas a obtener productos de alta calidad que cumplan con las necesidades del mercado actual.

Dentro del grupo de tecnologías emergentes de procesado están todas las tecnologías no térmicas de conservación, que son aquellas que no utilizan la

temperatura como principal forma de inactivación de microorganismos y enzimas. Si bien es cierto que en la mayoría de estos tratamientos se produce un leve incremento de la temperatura, este nunca llega a ser tan elevado como en un tratamiento térmico. Entre estas nuevas tecnologías se encuentran los campos magnéticos oscilatorios, pulsos eléctricos de alta intensidad, ultrasonidos de alta intensidad, la irradiación y las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP). De entre todas, la tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) ha demostrado con distintos tipos de alimentos que es capaz de conservar en gran medida las propiedades sensoriales y nutritivas a temperatura ambiente, presentando niveles adecuados de inactivación de microorganismos y enzimas. Es por esto que las HHP están adquiriendo una gran relevancia en los últimos años como alternativa en la conservación, por ejemplo, de productos cárnicos loncheados, ostras crudas, jaleas de fruta y mermeladas, zumos de fruta, aliños para la ensalada, calamar crudo, pasteles de arroz, hígado de pato, jamón y guacamole, platos preparados, entre otros, ya que se han obtenido resultados relevantes en inactivación de microorganismos y enzimas sin alterar su calidad final (Polydera et al. 2003). Todo ello hace de las HHP la tecnología no térmica de conservación de alimentos más desarrollada comercialmente, con muy buena aceptación por parte de los consumidores, que valoran las características organolépticas de los productos tratados por presión, ya que los asocian a productos naturales y con muy poca transformación.

Para conseguir la inactivación microbiana se utilizan presiones que varían entre 100 y 800 MPa (Megapascuales) con tiempos relativamente cortos (del orden de pocos segundos a varios minutos) y en combinación con temperatura moderada

entre 20 y 50 °C. Las condiciones de procesado dependen principalmente del alimento a tratar y del microorganismo a inactivar. Por ejemplo, esta tecnología es todavía ineficaz con las esporas bacterianas en unas condiciones de presión y tiempo relativamente altas, ya que estas presentan una extrema resistencia a las altas presiones (Ratphitagsanti et al. 2009; Barbosa et al. 1999).

La resistencia de los microorganismos a los tratamientos de presurización, depende directamente del tipo de organismo y de las características de la matriz. Por lo general los mohos y levaduras son los más sensibles al incremento de la presión y las bacterias Gram negativas presentan una resistencia relativamente media. Sin embargo, las bacterias Gram positivas son las más resistentes entre las células vegetativas, no obstante son las esporas bacterianas las que necesitan presiones más elevadas junto con incrementos de temperatura inicial para obtener reducciones significativas en las concentraciones iniciales (Ratphitagsanti et al. 2009; Barbosa et al. 1999).

Se ha determinado como causa principal de la muerte celular las alteraciones morfológicas como: compresión del gas de las vacuolas, alargamiento de las células, separación de la membrana y pared celular, contracción de la pared celular con formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula (Huang et al. 2014; Yang et al. 2012; Mohamed et al. 2012). En especial los cambios se producen a nivel de pared celular, dependiendo directamente de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el microorganismo, ya que las células

en fase logarítmica presentan una mayor sensibilidad a las HHP, más que aquellas en fase estacionaria. Esto es debido a que en la fase de crecimiento exponencial se encuentran en división celular y por tanto la membrana es más sensible a los factores externos (Barbosa et al. 1999; Amiali et al. 2007).

El cloruro sódico (NaCl) es uno de los principales ingredientes de los alimentos y se encuentra presente en la mayoría de estos. Este compuesto no se adiciona únicamente para resaltar el sabor de las comidas, sino que juega un papel importante tanto en la textura como en el control de ciertos microorganismos. Según lo establecido por la World Health Organization (WHO) el consumo reiterativo de NaCl incrementa el riesgo cardiovascular, eleva la presión sanguínea, produce fallos en el riñón y de igual forma se ha asociado al desarrollo de diabetes y cáncer (HHS & USDA, 2010; WHO, 2013). Actualmente se recomienda una ingesta diaria de NaCl menor a 5g para adultos y 2g para niños, esto con la finalidad de reducir al máximo el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. En el programa regional propuesto por la WHO en 2013 para Europa llamado Health 2020 propone reducir en un 16% el contenido total de sal (NaCl) presente en los quesos. Debido a esto nace la necesidad de investigar el efecto que tiene esta reducción significativa de NaCl sobre la inactivación de microorganismos utilizando las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) como tecnología de conservación no térmica y sobre la conservación de productos alimenticios con bajos niveles de sal.

Actualmente no se cuenta con suficientes estudios sobre la influencia de diversas concentraciones de cloruro sódico (NaCl) sobre los microorganismos

tratados por Altas Presiones Hidrostáticas. El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto de distintas concentraciones de NaCl (0; 0,1; 0,5; 0,8%) sobre el tratamiento por HHP para la inactivación de microorganismos alteradores relacionados con la vida útil de queso fresco (*Penicillium aurantiogriseum*, *Rhodotorula glutinis*), utilizando condiciones de tratamiento equivalentes a las de pasteurización térmica (niveles de inactivación microbiana mayor a 5 ciclos log<sub>10</sub>), con la finalidad de cumplir con los criterios establecidos por la FDA (Food and Drug Administration) para microorganismos patógenos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivos microbianos**

Las cepas de microorganismos *P. aurantiogriseum* y *R. glutinis* utilizados para realizar este estudio se obtuvieron a partir de aislamientos ambientales industriales aportados por el Departamento de Ciencias de los Alimentos, Grupo de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA). Estas cepas se utilizaron porque presentaban características típicas de los microorganismos aislados en los procesos productivos industriales.

La levadura *R. glutinis* criopreservada se resuspendió en 15 mL de Caldo de Peptona y Extracto de Levadura (Yeast Extract Peptone Dextrose Broth YPD, Scharlab Chemie, Barcelona, España). Después de 30 minutos a 30 °C se transfirieron a un frasco de 500 mL que contenían YPD y se incubaron a 25 °C durante 72 horas en un baño termostático y con agitación a 70 rpm. El contenido del frasco de 500 mL se centrifugó dos veces a 5000 rpm durante 15



minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 100 mL de caldo YPD. Después de la última centrifugación los 100 mL se distribuyeron depositando 1 mL en viales de 2 mililitros que contenían 1 mL de caldo YPD con 20% de glicerol y se almacenaron inmediatamente a -80 °C. La concentración de cada vial fue de  $1 \times 10^7$  ufc/ mL.

Las esporas de *P. aurantiogriseum* se obtuvieron después de incubar el microorganismo durante 5 días a 25 °C en el medio sólido Potato Dextrose Agar (PDA, Scharlab Chemie, Barcelona, Spain). Las esporas se recuperaron en agua desionizada estéril y la suspensión se filtró posteriormente utilizando papel de filtro con tamaño de poro de 25µm, con el fin de eliminar los restos de micelios. Una vez recuperadas, el inóculo se estandarizó utilizando recuento en placa y conteo en cámara de Neubauer (Brand®, Wertheim, Alemania). La concentración final fue de  $1 \times 10^7$  ufc/mL.

## **Preparación medios de tratamiento HHP**

### **Medio de referencia**

Como sustrato de referencia se utilizó agua de peptona al 0,1% (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain). Los estudios se realizaron para concentraciones de cloruro de sodio de 0% (control); 0,1; 0,5 y 0,8%, a un pH final de 6,5.

Una vez estandarizadas las concentraciones de sal en medio de referencia, este se inoculó con una concentración conocida ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) de cada uno de los microorganismos. Posteriormente se depositaron 30 mL del medio de referencia con cada inóculo en bolsas de polietileno metalizadas y se termosellaron inmediatamente. Cada uno de los microorganismos suspendidos en medio de

referencia con las distintas concentraciones de NaCl se trataron por separado (*R. glutinis*, *P. aurantiogriseum*) y cada tratamiento se realizó por triplicado.

### **Queso fresco**

El queso fresco se compró en un supermercado local. La temperatura de transporte y durante el almacenamiento en el laboratorio se mantuvo aproximadamente a 4 °C. Se cortaron cubos de 30g de dicho queso fresco y cada cubo se inoculó con 3 mL en el centro y superficie. Este procedimiento se llevó a cabo tanto para *R. glutinis* como para *P. aurantiogriseum* para obtener una concentración final de  $1 \times 10^7$ . Los cubos inoculados se introdujeron en bolsas de polietileno metalizadas que se termosellaron inmediatamente. Cada tratamiento se realizó por triplicado y de forma independiente para cada microorganismo.

### **Tratamiento HHP**

Para cada tiempo y presión se utilizaron tres muestras independientes situadas en las bolsas de polietileno metalizadas y termoselladas (MULTIVAC, Thermosealer). El tratamiento se realizó utilizando una mezcla de agua con etilenglicol como agente presurizante. La temperatura se controló utilizando una camisa de refrigeración, conectada a un criostato para mantener la temperatura constante durante toda la fase experimental. La temperatura máxima de tratamiento fue de 32 °C (inicial de 20 °C).

La presión, la temperatura y el tiempo de tratamiento se controlaron automáticamente. El tiempo de subida de presión fue menor a 1 minuto en todas las experiencias. Las presiones utilizadas para tratar tanto el medio de referencia

como el queso fresco fueron de 200, 300, 350 y 400 MPa por un tiempo entre 1 y 15 minutos.

### **Análisis microbiológico**

Tras el tratamiento por HHP se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1% estéril (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain). Las muestras presurizadas se sembraron en profundidad por triplicado en agar PDA con adición de Cloranfenicol (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain). Para *R. glutinis* y *P.aurantiigriseum* se realizó una incubación de 3 a 5 días, respectivamente, a 25 °C.

### **Cinéticas de inactivación por HHP**

Las curvas de supervivencia se ajustaron al modelo de distribución de frecuencias de Weibull (Ecuación 1) ya que ha mostrado su capacidad para describir el comportamiento microbiano al tratamiento por tecnologías térmicas y no térmicas de conservación (Coroller et al. 2012; Rodrigo et al. 2003, Sampedro et al. 2006; Fernández et al. 2002; Collado et al. 2003), tanto en medio de referencia (Pina-Pérez et al. 2007) como en matrices reales (Elez-Martinez et al. 2007; Igual et al. 2013). Este modelo consiste en una distribución de frecuencias que considera al microorganismo como una población, donde cada individuo tiene una resistencia al tratamiento, por lo tanto las curvas de inactivación representan la distribución de la resistencia del conjunto de la población al tratamiento.

$$\log(S) = -bt^n$$

**Ecuación 1.**

donde  $S$  es la fracción de supervivientes,  $t$  es el tiempo de tratamiento expresado en minutos,  $b$  es el parámetro de escala expresado en este caso en MPa relacionado con la intensidad del tratamiento y  $n$  es el parámetro de forma, cuyo valor depende de la forma de la curva de supervivencia.

Cuando el valor de  $n < 1$  las curvas de supervivencia presentan colas, es decir, la fracción residual de células que quedan por inactivar a tiempos largos, tienen menos probabilidades de morir, son las más resistentes, o las que mejor se han adaptado al estrés producido por los tratamientos. No obstante cabe destacar que este comportamiento también puede ser debido a que esos valores ya se encuentran muy cerca del valor máximo posible de inactivación establecido por la concentración de inóculo inicial, de tal manera que las colas pueden ser simplemente la máxima inactivación posible a esa concentración inicial de microorganismos ( $N_0$ ). Cuando el valor de  $n > 1$ , las curvas de supervivencia presentan hombros indicando que para tiempos cortos de tratamiento las células son resistentes, hasta un punto en el que tiempos más largos de tratamiento se traducen en niveles mayores de inactivación. En el caso de que el valor de  $n = 1$  la probabilidad de que el microorganismo muera no depende del tiempo de tratamiento; en otras palabras, cada célula es igual de sensible al tratamiento sin importar lo que dure el mismo.

## **Análisis estadístico**

Para evaluar el efecto de la presión, tiempo y la concentración de cloruro de sodio en la inactivación microbiana de *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum*, se realizó análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias, con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó la distribución de Fisher (L.S.D) para contrastar la igualdad de varianzas. Todos los datos estadísticos se obtuvieron con Statgraphics centurion XV, StatPoint, Inc.

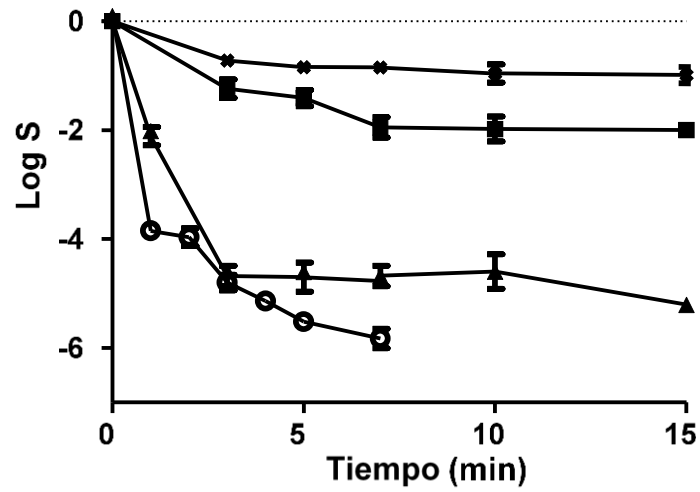
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Efecto de las concentraciones de NaCl y HHP sobre *R. glutinis* en medio referencia.**

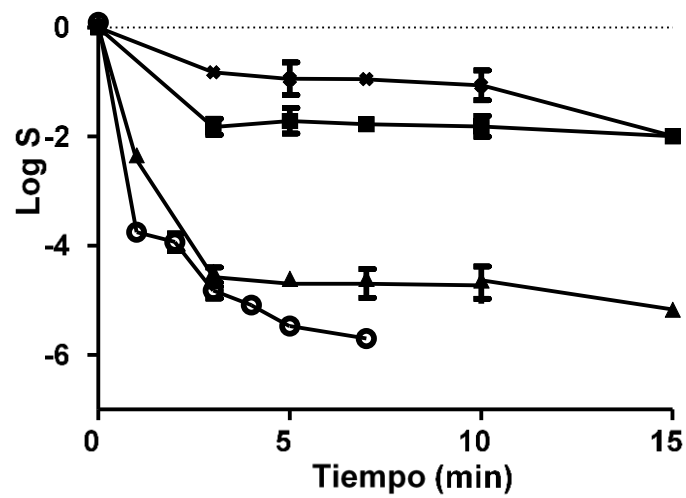
En la figura 1 se pueden observar las curvas de supervivencia para *Rhodotorula glutinis* tratada por HHP en medio de referencia. Ambos parámetros de proceso, Presión (P, MPa) y el tiempo de tratamiento (t, min), afectaron significativamente ( $p < 0,05$ ) a los niveles de inactivación alcanzados. A medida que se incrementa la presión de tratamiento aumenta la inactivación, obteniéndose una inactivación máxima de  $5,91 \pm 0,28$  ciclos logarítmicos a una presión de 350 MPa por 5 min, con una temperatura inicial de tratamiento 20 °C (temperatura final 32 °C) y pH 6,5, independientemente de la concentración de NaCl añadida al medio. Además, para cada nivel de presión se produce una disminución rápida en el número de supervivientes a tiempos cortos, 1 ciclo  $\log_{10}$  a 200 MPa durante 5 min; 4,50 ciclos  $\log_{10}$  a 300 MPa durante 3 min y 4 ciclos  $\log_{10}$  a 350 MPa durante 1 min, con la presencia de colas a tiempos largos. Este comportamiento de los microorganismos ha sido también observado por diversos autores en el

tratamiento con tecnologías térmicas a temperaturas de pasteurización y no térmicas de conservación (Pina-Pérez et al. 2007; Chen & Hoover, 2004; Torres et al. 2008).

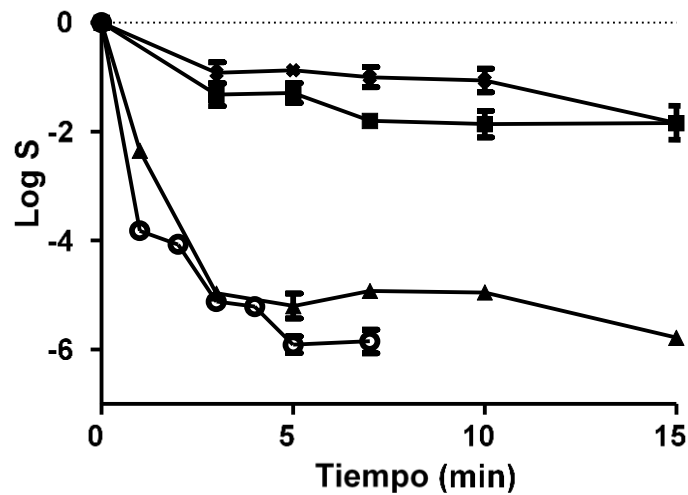
(A)



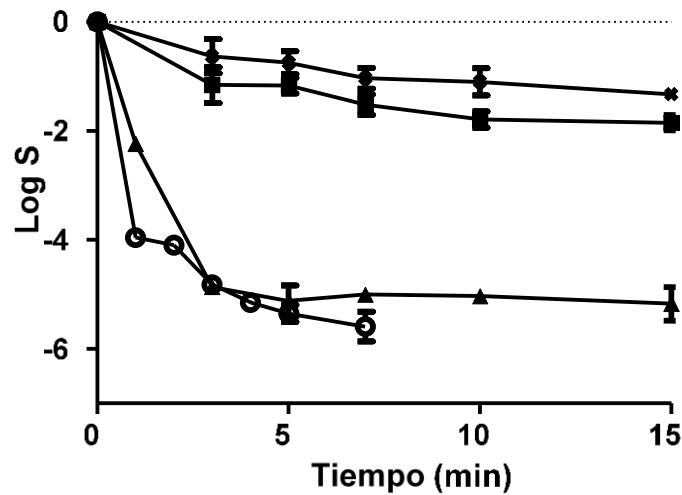
(B)



(C)



(D)

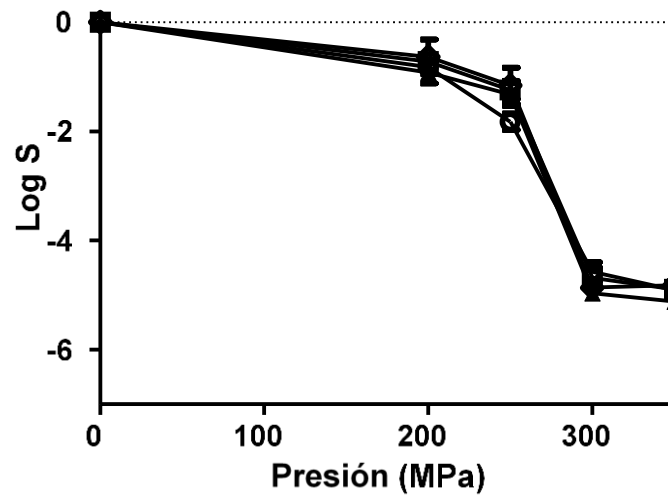


**Figura 1.** Inactivación de *R. glutinis* en agua de peptona a diferentes tiempos, concentraciones de NaCl (A) 0%, (B) 0,1%, (C) 0,5%,(D) 0,8% y presiones (X) 200, (■) 250 (▲) 300, (○) 350 MPa, pH: 6,5 y temperatura de tratamiento de 20 °C.

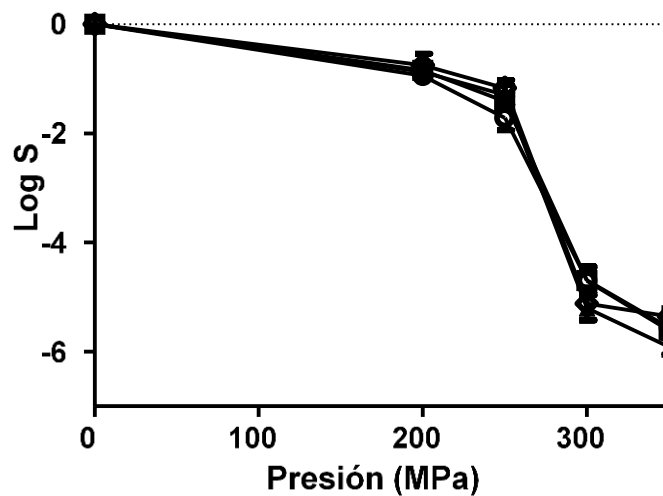
En cuanto al efecto de las diversas concentraciones de NaCl en el medio de referencia, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los niveles de inactivación alcanzados para cada una de las concentraciones estudiadas, a las diferentes presiones y tiempos de tratamiento. Por tanto no parece que exista una interacción entre la presión y la concentración de cloruro de sodio, como se

puede observar en la figura 2, para los tiempos de 3, 5 y 7 minutos comunes a todos los tratamientos. Estos resultados coinciden con estudios llevados a cabo con bacterias en los que también se concluye que no existe una interacción entre las bajas concentraciones de cloruro de sodio y el tratamiento por altas presiones. Entre ellos destaca el publicado por Durantón et al. (2012) quienes indicaron que la combinación de las concentraciones de 1,5 a 3 % de cloruro sódico con tratamientos de 350 MPa durante 6 min a 20 °C no producían una reducción significativa de la carga inicial de microorganismos.

(A)

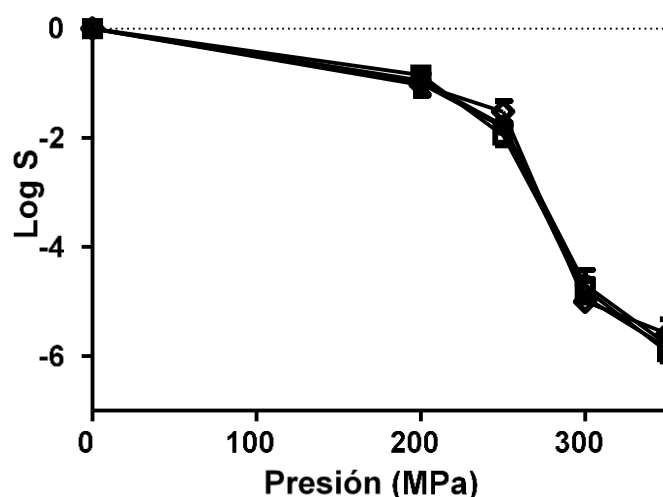


(B)





(C)



**Figura 2.** Efecto del cloruro de sodio en el tratamiento de altas presiones, en la inactivación de *R. glutinis* en medio de referencia agua de peptona a tiempos comunes (A) 3, (B) 5, (C) 7 minutos y concentraciones de NaCl (□) 0%; (○) 0,1%, (▲) 0,5%, (◇) 0,8%, pH: 6,5 a la temperatura de tratamiento de 20 °C.

### Modelización Matemática

Las curvas de supervivencia obtenidas tras el tratamiento por HHP de la levadura *Rhodotorula glutinis*, bajo las diferentes condiciones en estudio presentan colas. En este caso el modelo de función de distribución de Weibull parece adecuado de acuerdo a bibliografía existente (Donsì et al. 2013; Pina-Pérez et al. 2012) para la descripción del comportamiento microbiano bajo el efecto de las HHP. En la tabla 1 se se pueden observar los valores de los parámetros cinéticos del modelo ( $b$  y  $n$ ), así como los indicadores de la bondad del ajuste ( $R^2$  ajustado y MSE). Como se desprende de los datos de la tabla 1, el parámetro  $b$  del modelo de Weibull aumenta a medida que se incrementa la intensidad de tratamiento. Valores de  $b$  altos indican una mayor rapidez en la

inactivación celular y por tanto una mayor sensibilidad de las células bajo las condiciones más intensas de tratamiento. El parámetro de forma,  $n$ , resultó en todos los casos  $<1$ , indicando la concavidad de las curvas de supervivencia obtenidas. Para un mismo nivel de presión los tiempos más largos de tratamiento no se traducen en incrementos significativos en el nivel de inactivación. Este comportamiento podría indicar, de acuerdo a estudios previos llevados a cabo por Peleg, (2000) y Buzrul et al. (2005) en otros microorganismos, que existen subpoblaciones supervivientes más resistentes a los tratamientos. No obstante, cabe destacar que este comportamiento también puede ser debido a que esos valores ya se encuentran muy cerca del valor máximo posible de inactivación establecido por la concentración de inóculo inicial, de tal manera que las colas pueden ser simplemente la máxima inactivación posible a esa concentración inicial de microorganismos ( $N_0$ ).

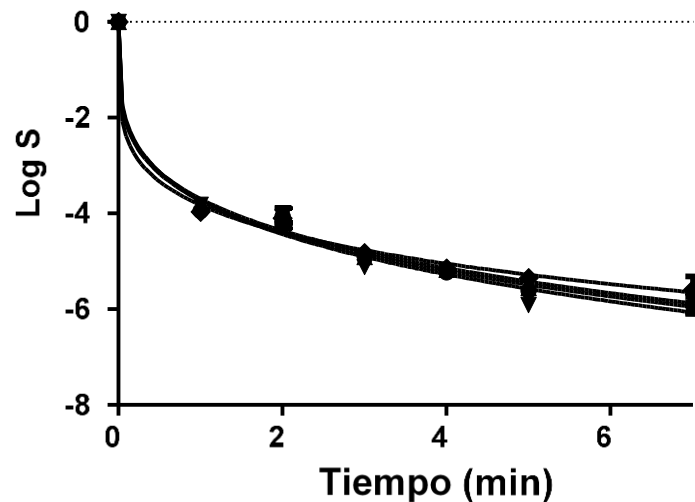
**Tabla 1.** Valores del parámetro  $b$  y  $n$  del modelo de Weibull, valores de  $R^2$ -ajustado y MSE en las curvas de supervivencia de *R. glutinis* a diferentes presiones

Presión	Concentración	Modelo Weibull		$R^2$ -ajustado	MSE
		$b$	$n$		
MPa	% NaCl				
200	0,0	0,40 (0,09)*	0,19 (0,04)	0,996	0,02
	0,1	0,30 (0,05)	0,66 (0,05)	0,901	0,05
	0,5	0,38 (0,07)	0,54 (0,10)	0,901	0,04
	0,8	0,38 (0,05)	0,46 (0,08)	0,989	0,00
250	0,0	1,95 (0,04)	0,30 (0,06)	0,963	0,02

	0,1	1,62 (0,07)	0,06 (0,02)	0,991	0,08
	0,5	1,50 (0,09)	0,24 (0,10)	0,963	0,10
	0,8	1,77 (0,14)	0,34 (0,04)	0,980	0,07
	0,0	3,20 (0,03)	0,23 (0,02)	0,920	0,09
300	0,1	3,10 (0,09)	0,21 (0,00)	0,995	0,02
	0,5	3,21 (0,10)	0,23 (0,01)	0,986	0,08
	0,8	3,22 (0,05)	0,21 (0,06)	0,999	0,01
	0,0	3,73 (0,05)	0,24 (0,00)	0,993	0,11
350	0,1	3,65 (0,10)	0,25 (0,03)	0,992	0,04
	0,5	3,61 (0,08)	0,29 (0,07)	0,989	0,06
	0,8	3,80 (0,11)	0,21 (0,05)	0,990	0,03

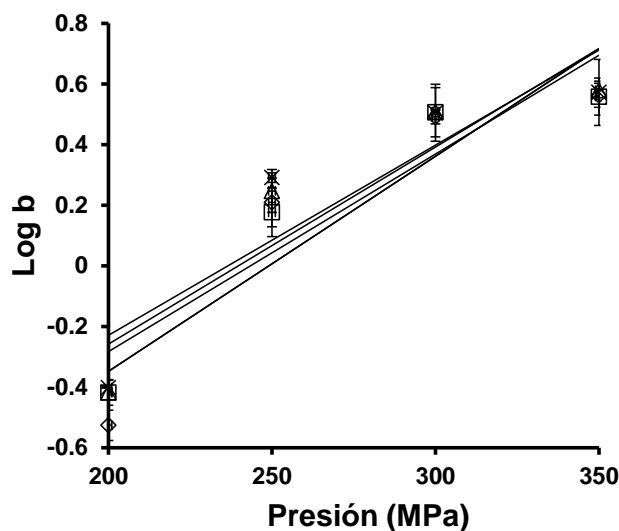
\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

La figura 3 muestra un ejemplo de ajuste al modelo de Weibull para los datos experimentales obtenidos para la presión de 350 MPa y concentraciones 0; 0,1; 0,5 y 0,8 % de NaCl. Como se puede apreciar, a partir del minuto 3 de tratamiento no hay diferencias en la reducción de la carga microbiana, dando lugar a colas, lo cual podría indicar la presencia de una población residual resistente al tratamiento. Tal como se ha comentado anteriormente, las colas pueden ser también un reflejo de la máxima inactivación posible a esa concentración inicial de microorganismos ( $N_0$ ).



**Figura 3.** Ajuste de datos experimentales al modelo de Weibull (-) para presión de 350 MPa y concentraciones (●)0; (▲) 0,1;(▼) 0,5; (◆) 0,8 % de NaCl.

La figura 4 muestra la relación entre los valores del logaritmo del parámetro cinético  $b$  para *R. glutinis* con la presión (200, 250, 300, 350 MPa) para cada una de las concentraciones de NaCl (0; 0,1; 0,5; 0,8%) estudiadas. Se puede observar que existe una relación lineal, lo que significa que al incrementar la presión de tratamiento, aumenta la velocidad con la que se reduce la carga inicial inoculada. No obstante, cabe destacar que incrementar la presión en 50 MPa para los tratamientos de 300 a 350 MPa no produjo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) sobre el parámetro cinético que marca la velocidad de inactivación microbiana. No se observan tampoco variaciones entre los valores obtenidos para el log de  $b$  a cada una de las concentraciones de NaCl estudiadas. Por lo tanto, un incremento o disminución del porcentaje de NaCl en el medio de referencia (agua de peptona) no parece afectar a la velocidad con la que se reduce la carga microbiana.



**Figura 4.** Ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull, a concentraciones de NaCl (X) 0%, ( $\diamond$ ) 0,1%, ( $\square$ ) 0,5%, ( $\Delta$ ) 0,8%, a las presiones de tratamiento estudiadas.

A partir de las curvas obtenidas en la figura 4 se calculó el valor  $z$  de presión ( $z_P$ ), definido como la inversa negativa de la pendiente de la recta que enfrenta el  $\log_{10}$  de  $b$  frente a la Presión. Los valores de  $z_P$  se pueden observar en la tabla 2. Los resultados indican que es necesario incrementar el nivel de la Presión entre 140 y 158 MPa para disminuir 1 unidad el logaritmo de  $b$ . Estos valores de  $z_P$  no se vieron alterados por las concentraciones de NaCl presentes en el medio. En estudios anteriores realizados por Basak et al. (2002) y Zook et al. (1999) con *Saccharomyces cerevisiae* en diversas matrices como zumo de manzana, tampón fosfato y zumo de naranja, a un pH de 5, se obtuvieron valores de  $z_P$  de 115, 120 y 135 MPa respectivamente, datos ligeramente inferiores a los obtenidos en el presente estudio.

**Tabla 2.** Valor z de presión ( $z_p$ ) para *R. glutinis* a presiones de 200, 250,300, 350 MPa y concentraciones de 0; 0,1; 0,5; 0,8 % NaCl a temperatura de tratamiento de 20 °C.

Concentración NaCl (g/100ml)	Valor $Z_p$
0	158,73
0,1	140,85
0,5	153,85
0,8	153,85

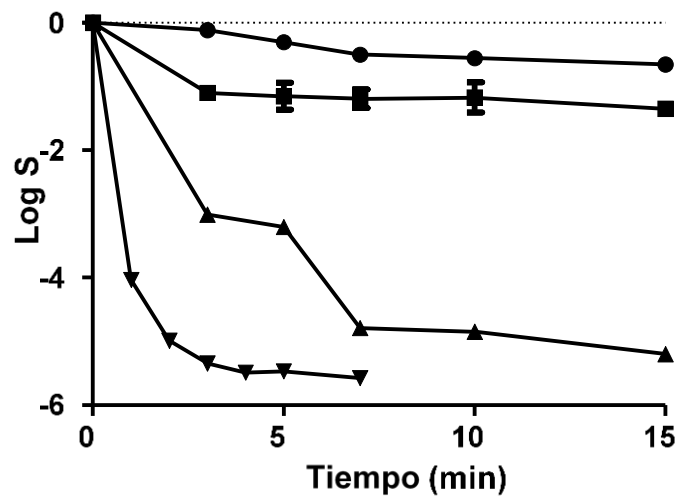
**Efecto Altas Presiones Hidrostáticas sobre *P. aurantiogriseum* en medio referencia agua de peptona.**

Los estudios llevados a cabo con las esporas de *P. aurantiogriseum* indicaron que son más resistentes a los tratamientos por presión que la levadura tratada anteriormente. Por ejemplo, si nos fijamos en los tratamientos de 200 y 300 MPa se produjo tan solo una reducción cercana a 1 ciclo logarítmico (Figura 5). Fue necesario incrementar la presión hasta los 350 MPa para observar reducciones significativas. Este comportamiento fue similar para todas las concentraciones de NaCl, con un valor promedio máximo de 4,5 ciclos logarítmicos de inactivación a un tiempo de 10 minutos. Sin embargo, al incrementar la presión a 400 MPa la viabilidad de las esporas de *P. aurantiogriseum* se redujo drásticamente, obteniéndose niveles de inactivación de 4 ciclos logarítmicos para la combinación presión-tiempo de 400 MPa durante 1 min. Un incremento en el tiempo de tratamiento supuso así mismo un aumento en el nivel de inactivación

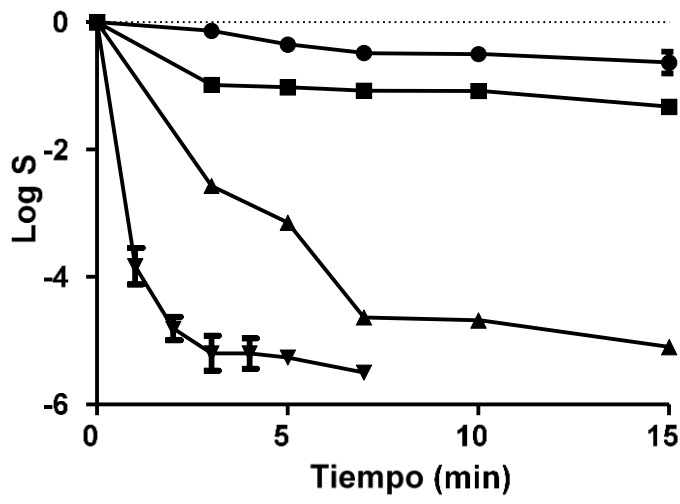
de esporas, logrando producir una reducción de hasta un máximo de 5,20 ciclos logarítmicos tras 3 minutos de tratamiento a 400 MPa.

Existen estudios previos en relación a la resistencia de esporas de *Penicillium spp* tratadas por HHP, en los que se alcanzaron niveles máximos de inactivación de 3 a 6 ciclos  $\log_{10}$  para tratamientos de 300 MPa durante 5 min, 25 °C, pH 4,9 y 600 MPa durante 10 min, 20 °C, pH 4,5, respectivamente (Akdemir Evrendilek et al. 2008; Voigt et al. 2010). O'Reilly et al. (2000) estudiaron el efecto del tratamiento de HHP sobre la cepa de *P. roqueforti* en diversas matrices, alcanzando niveles máximos de inactivación de 6 ciclos  $\log_{10}$  aunque con tiempos de tratamiento relativamente elevados (más de 20 minutos). En el presente trabajo los resultados han sido similares, observándose una reducción para *P. aurantiogriseum* de aproximadamente 6 ciclos  $\log_{10}$  para la presión de 400 MPa, incluso con tiempos de tratamiento muy inferiores. Sin embargo, cuando se incrementó el tiempo y se superaron los 3 minutos de tratamiento no se produjo una mayor reducción celular que la obtenida previamente con el tratamiento de 400 MPa a 3 minutos (curvas de supervivencia con colas). En todos los casos la temperatura inicial de tratamiento fue de 20 °C.

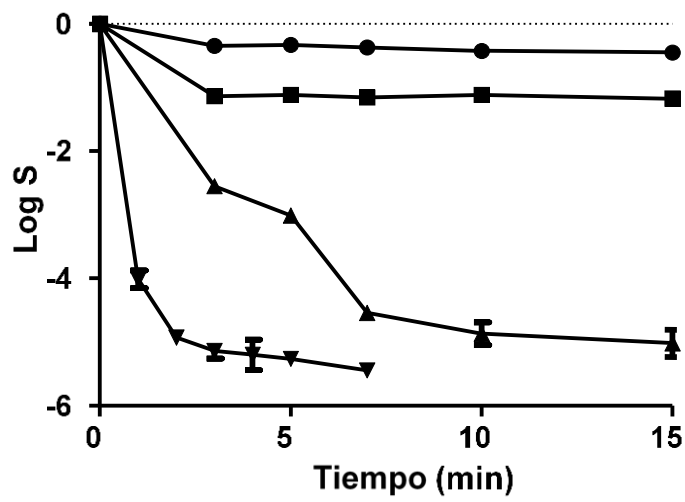
(A)



(B)

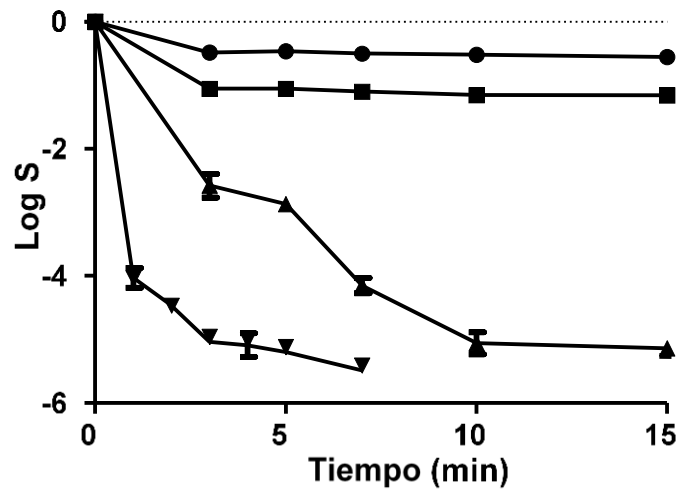


(C)





(D)



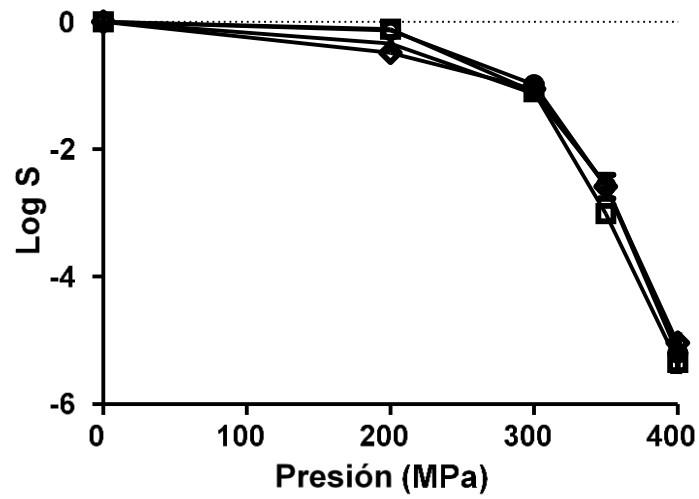
**Figura 5.** Curvas de supervivencia de *P. aurantiogriseum* en medio de referencia (agua de peptona) para las distintas concentraciones de NaCl (A) 0% (B) 0,1%, (C) 0,5%, (D) 0,8% y presiones (●) 200, (■) 300, (▲) 350, (▼) 400 MPa, a una temperatura de tratamiento de 20 °C

En cuanto al efecto de la concentración de NaCl en el medio de referencia, se observaron resultados similares a los obtenidos con la levadura *R. glutinis*, evidenciando nuevamente que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los niveles de inactivación alcanzados por HHP para cada una de las concentraciones de cloruro de sodio estudiadas, presiones y tiempos de tratamiento. Por tanto, con los resultados obtenidos de forma experimental no se observa una relación entre la concentración de cloruro de sodio y la disminución de la carga de esporas de *P. aurantiogriseum*. Esta tendencia se puede observar en la figura 6, para los tiempos de 3, 5, 7 minutos comunes en todas las presiones de trabajo.

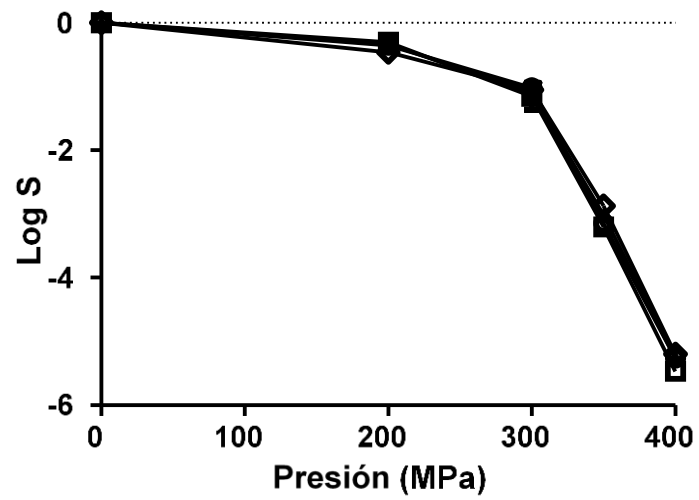
Según estudios previos publicados por Koseki & Yamamoto, (2007) el efecto baroprotector del cloruro sódico se presenta a concentraciones superiores al

15%, llegando incluso a neutralizar por completo el efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas. Con lo indicado anteriormente se puede deducir que concentraciones muy bajas de NaCl en agua de peptona como las utilizadas en este estudio no presentan un efecto baroprotector.

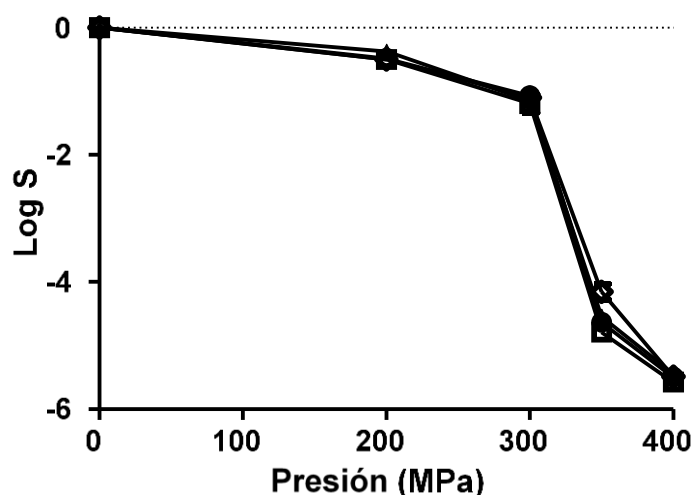
(A)



(B)



(C)



**Figura 6.** Efecto del cloruro de sodio en el tratamiento de altas presiones, en la inactivación de *P. aurantiogriseum* en medio referencia agua de peptona a tiempos comunes (A) 3, (B) 5, (C) 7 minutos y concentraciones de NaCl ( $\square$ ) 0%; ( $\circ$ ) 0,1%, ( $\blacktriangle$ ) 0,5%, ( $\diamond$ ) 0,8%, a temperatura de tratamiento de 20 °C.

### Modelización matemática

De igual forma que para *R. glutinis*, los datos experimentales de supervivencia se ajustaron al modelo de distribución de frecuencias de Weibull. Como se puede observar en la tabla 3 el parámetro  $b$  del modelo de Weibull aumenta a medida que se incrementa la intensidad de tratamiento. Por lo tanto, este parámetro como en el caso anterior se puede considerar como un parámetro cinético en la inactivación de *P. aurantiogriseum* por HHP. En cuanto a los valores de  $n$  se observó que en todos los casos eran menores de 1, indicando la existencia de colas.

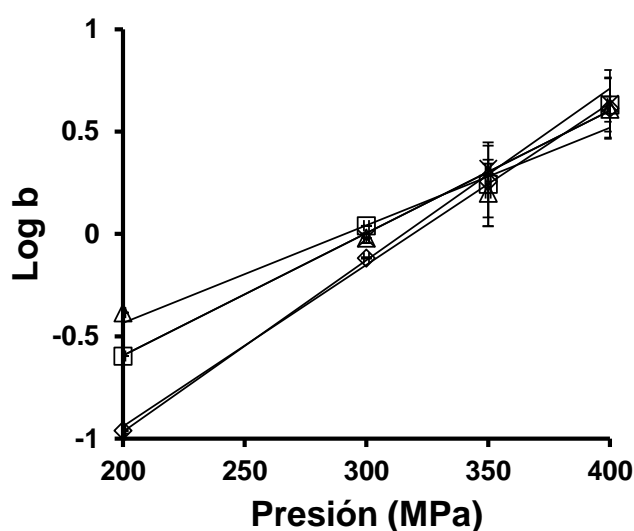
**Tabla 3.** Valores del parámetro  $b$  y  $n$  del modelo de Weibull, valores de  $R^2$ -ajustado y MSE en las curvas de supervivencia de *P. aurantiogriseum* a diferentes presiones.

Presión	Concentración	Modelo Weibull		R <sup>2</sup> -ajustado	MSE
		$b$	$n$		
MPa	% NaCl				
200	0,0	0,09 (0,03)*	0,74 (0,10)	0,927	0,05
	0,1	0,11 (0,05)	0,66 (0,05)	0,938	0,00
	0,5	0,25 (0,10)	0,21 (0,04)	0,990	0,00
	0,8	0,41 (0,08)	0,10 (0,05)	0,995	0,00
300	0,0	0,95 (0,00)	0,11 (0,02)	0,994	0,02
	0,1	0,76 (0,11)	0,18 (0,05)	0,986	0,00
	0,5	1,10 (0,07)	0,02 (0,01)	0,998	0,00
	0,8	0,96 (0,15)	0,07 (0,03)	0,999	0,00
350	0,0	2,08 (0,13)	0,35 (0,09)	0,962	0,03
	0,1	1,80 (0,11)	0,40 (0,04)	0,962	0,18
	0,5	1,75 (0,20)	0,41 (0,06)	0,956	0,21
	0,8	1,58 (0,15)	0,46 (0,06)	0,965	0,16
400	0,0	4,33 (0,21)	0,15 (0,07)	0,989	0,16
	0,1	4,12 (0,09)	0,16 (0,05)	0,989	0,15
	0,5	4,27 (0,14)	0,14 (0,03)	0,992	0,13
	0,8	4,07 (0,19)	0,16 (0,00)	0,998	0,06

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

La figura 7 muestra la relación entre el log de  $b$  y la presión para *P.aurantiogriseum*. Se observa que el parámetro  $b$  del modelo de Weibull presentó una relación lineal con la presión indicando que una mayor intensidad

en la presión de tratamiento incrementaba significativamente ( $P < 0,05$ ) la velocidad de inactivación de las esporas. Esta tendencia se observó para todas las concentraciones de cloruro de sodio estudiadas. De igual manera no se presentó una tendencia definida para el parámetro  $b$  dentro de cada presión para las distintas concentraciones de NaCl, por lo tanto no se puede considerar que existan diferencias entre los valores de  $b$  obtenidos para las concentraciones de NaCl evaluadas bajo una misma presión.



**Figura 7.** Ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull ( $\log_{10} b$ ), a concentraciones de NaCl (X) 0% ( $\diamond$ ) 0.1%, ( $\square$ ) 0.5%, ( $\Delta$ ) 0.8%, a las presiones de tratamiento estudiadas.

De igual forma que para *R.glutinis* se realizó el cálculo del valor  $z_P$ . Este valor se define como la inversa negativa de la pendiente de la recta enfrentando el  $\log_{10}$  de  $b$  frente a la Presión de trabajo dada en MPa (figura 7). Los valores de  $z_P$  se pueden observar en la tabla 4, siendo necesario incrementar el nivel de la Presión entre 119 y 208 MPa para disminuir 1 unidad el logaritmo de  $b$ . En este caso específico estos valores dependieron directamente de la concentración de NaCl presente en el medio de referencia (agua de peptona).

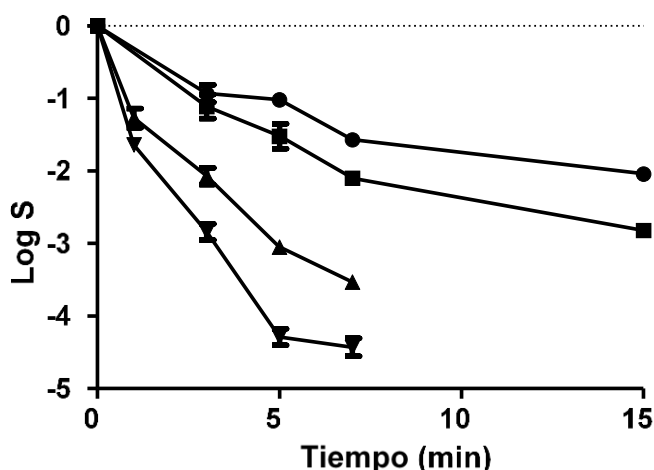
Al comparar los valores de  $z_p$  obtenidos para los dos microorganismos se observa una mayor sensibilidad de la levadura *R. glutinis* ( $Z_p=153$ ) con respecto a las esporas de *P. aurantiogriseum* ( $Z_p=208$ ) a la concentración de 0,8% de cloruro sódico para la temperatura de 20 °C y pH de 6,5. Sin embargo, en estudios realizados por O'Reilly et al. (2000) con esporas de *P. roqueforti* IMI 297987 en una matriz alimentaria, queso a pH 5,2, se obtuvo un valor  $z_p= 95$  MPa, siendo inferior al obtenido en el presente estudio. Estas diferencias en el valor  $z$  de presión se pueden deber a varios factores: la matriz, el pH y a las características propias de las cepas utilizadas, ya que las cepas aisladas de alimentos o de muestras ambientales presentan generalmente una mayor baroresistencia que aquellas que provienen de cultivos tipo (Cheftel, 1995).

**Tabla 4.** Valor  $z$  de presión ( $z_p$ ) para *P. aurantiogriseum* a presiones de 200, 300, 350, 400 MPa y concentraciones de 0; 0,1; 0,5; 0,8 % NaCl a temperatura de tratamiento de 20 °C.

Concentración NaCl (g/100ml)	Valor $Z_p$
0	119,05
0,1	126,58
0,5	166,67
0,8	208,33

### Efecto HHP sobre *Rhodotorula glutinis* en queso fresco.

En la figura 8 se observan las curvas de supervivencia para *R. glutinis* tratada por HHP. Los resultados obtenidos indicaron que hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre cada uno de los niveles de inactivación alcanzados. Al aumentar la presión se incrementa la inactivación para un mismo tiempo de tratamiento, obteniéndose la mayor reducción de 4,29 ciclos logarítmicos a una presión de 350 MPa durante 5 min, con una temperatura inicial de tratamiento de 20 °C (temperatura final 32 °C) y pH 5,35. Se puede observar que al incrementar los niveles de presión se presentaron caídas rápidas de la concentración microbiana a tiempos cortos, 1 ciclo  $\log_{10}$  para una presión de 200 MPa durante 5 min y 4 ciclos  $\log_{10}$  para 350 MPa durante 5 min. Se observan colas a partir de los 7 minutos de tratamiento para las presiones de 200 y 250 MPa, por lo que un incremento del tiempo de tratamiento no significó una mayor inactivación. Esta tendencia se repitió a partir del tratamiento a 350 MPa durante 5 minutos. Este comportamiento de las curvas de supervivencia microbiana es similar a lo que ocurría en medio de referencia y ha sido observado por diversos autores en el tratamiento con tecnologías térmicas y no térmicas de conservación (Carreño et al. 2011; Moody et al. 2014; Chen & Hoover, 2004; Koseki & Yamamoto, 2014)



**Figura 8.** Inactivación de *R. glutinis* en queso fresco a diferentes tiempos de tratamiento, concentración de 0,5% NaCl y presiones (●) 200, (■) 250, (▲) 300, (▼) 350 MPa, pH: 5,35 y temperatura inicial de 20 °C.

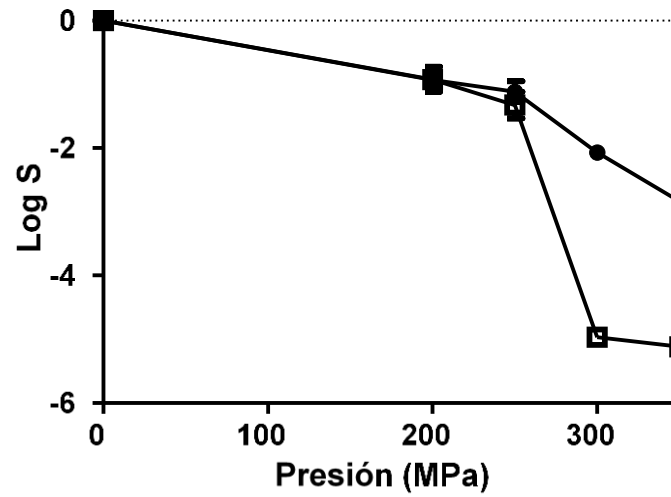
En cuanto al efecto de la matriz queso fresco sobre la inactivación de *R. glutinis*, se pudo observar que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los datos experimentales obtenidos para cada matriz, con una concentración de 0,5% de NaCl bajo los tiempos comunes de 3, 5 y 7 minutos. Como se puede observar en la figura 9, en todos los casos a partir de los 300 MPa el efecto de las altas presiones sobre el microorganismo es mayor cuando está suspendido en el medio de referencia que cuando está inoculado en el queso fresco. Sin embargo, a presiones por debajo de los 300 MPa no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los niveles de inactivación a ninguno de los tiempos del estudio. En la figura 9 (A) se puede observar que se obtuvieron reducciones de 2,8 ciclos  $\log_{10}$  en queso fresco frente a los 5,1 ciclos  $\log_{10}$  en medio de referencia a la presión de 350 MPa durante 3 min. En la figura 9 (B) se aprecian reducciones de 4,3 ciclos  $\log_{10}$  en queso fresco frente a los 5,9 ciclos  $\log_{10}$  del medio agua de pepona para un el tratamiento a 350 MPa durante 5 minutos. En la figura 9 (C) se observa un comportamiento similar de tal forma que la diferencia en inactivación entre el queso fresco y el agua de peptona fue de 1,42 ciclos  $\log_{10}$  a 350 MPa durante 7 minutos.

Estos resultados ponen de manifiesto el importante efecto que el sustrato puede tener en la inactivación de los microorganismos. En este caso en concreto parece que existe un efecto protector del queso, bien por su composición o por su estado sólido frente al agua de peptona que es un medio líquido. Por tanto los estudios

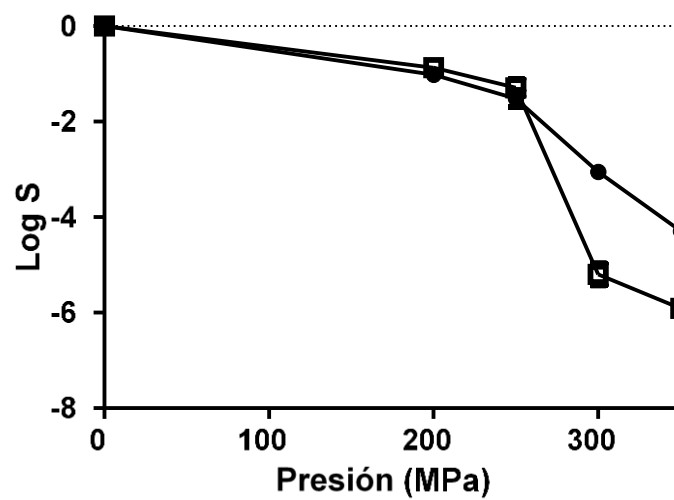


en las propias matrices alimentarias son un requisito imprescindible para dimensionar correctamente los tratamientos de conservación.

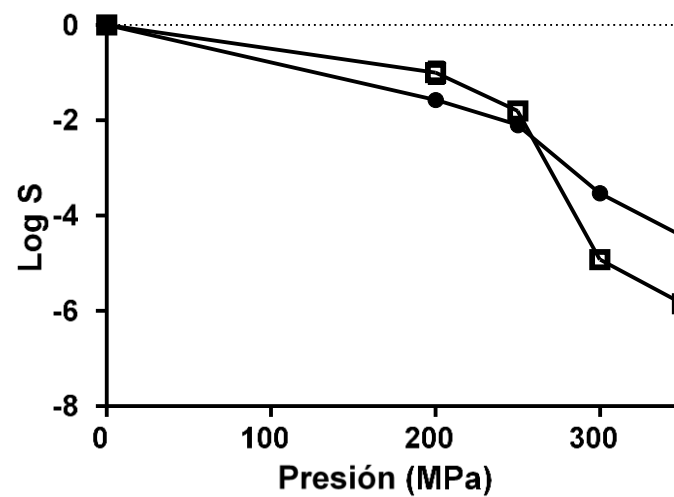
(A)



(B)



(C)



**Figura 9.** Inactivación de *R. glutinis* en queso fresco a tiempos (A) 3, (B) 5, (C) 7 minutos, concentración de NaCl 0,5% en (□) medio referencia agua peptona y (●) queso fresco inoculado, pH: 5,35 y temperatura de tratamiento de 20 °C.

### **Modelización**

En la tabla 5 se comparan los parámetros del ajuste de las curvas de supervivencia en queso fresco y en agua de peptona al modelo de distribución de frecuencias de Weibull. Como se puede observar el parámetro *b* aumenta a medida que se incrementa la intensidad de tratamiento, siendo menor el incremento del parámetro en la matriz queso fresco para el tratamiento de 350 MPa, indicando por tanto una mayor resistencia de la cepa *R. glutinis* cuando se encuentra en el queso fresco tratado por HHP. Al realizar la comparación de los datos obtenidos en cada uno de los medios, se demuestra efectivamente que existe un cierto efecto protector de la matriz sobre las levaduras inoculadas en queso fresco tratado por HHP. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Fernández et al. (2002) donde se observó que cambios en el medio modifican los resultados de inactivación obtenidos. El comportamiento del parámetro de forma, *n*, resultó en todos caso menor a 1, indicando la concavidad de las curvas de supervivencia obtenidas.

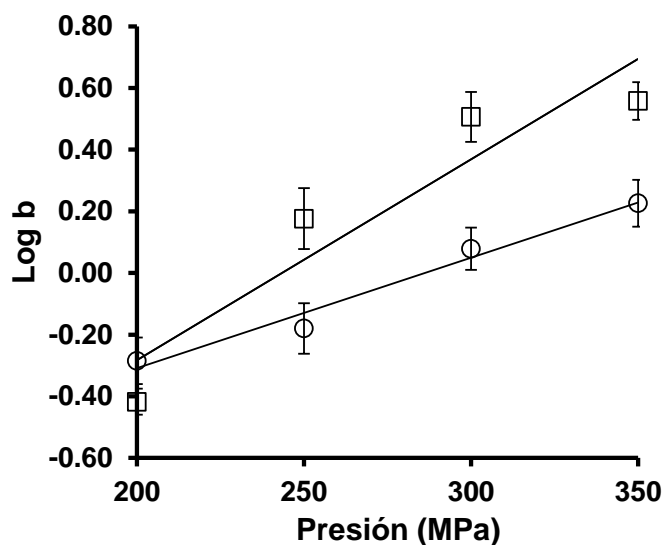
**Tabla 5.** Valores del parámetro  $b$  y  $n$  del modelo de Weibull, valores de  $R^2$ -ajustado y MSE en las curvas de supervivencia de *R. glutinis* a diferentes presiones en medio referencia con 0,5% NaCl y queso fresco.

Presión (MPa)	Medio	Modelo Weibull		$R^2$ - ajustado	MSE
		$b$	$n$		
200	0,5% NaCl	0,38 (0,07)*	0,54 (0,10)	0,902	0,04
	Queso fresco	0,52 (0,10)	0,51 (0,01)	0,977	0,08
250	0,5% NaCl	1,50 (0,09)	0,24 (0,10)	0,963	0,10
	Queso fresco	0,66 (0,02)	0,54 (0,04)	0,988	0,08
300	0,5% NaCl	3,21 (0,10)	0,23 (0,01)	0,986	0,08
	Queso fresco	1,20 (0,09)	0,56 (0,03)	0,953	0,07
350	0,5% NaCl	3,61 (0,08)	0,29 (0,07)	0,989	0,06
	Queso fresco	1,68 (0,07)	0,52 (0,09)	0,984	0,08

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

A partir de los valores de  $b$  se calcularon los valores de  $z_p$  para cada una de las matrices representando el logaritmo de  $b$  frente a la presión (Figura 10). Se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el  $z_p$  para cada uno de los medios bajo estudio (queso fresco y agua de peptona). Al obtener los valores  $z_p$  a partir de las curvas, como la inversa negativa de la pendiente, se obtuvieron valores superiores de incremento de presión en el caso del queso fresco (278 MPa) que en el medio de referencia (154 MPa) para disminuir 1 unidad el logaritmo de  $b$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por (Lin et al. 1994; Erkmen, 2001), quienes observaron que la presencia en los medios de

proteínas, sal o grasas reducía la eficiencia de los tratamientos de conservación sobre *Escherichia coli*. También observaron que existían diferencias significativas en la inactivación microbiana al estudiar diversos medios (caldo nutritivo, leche entera y desnatada) presentando datos que soportan que estos componentes pueden proteger las estructuras y membranas células.

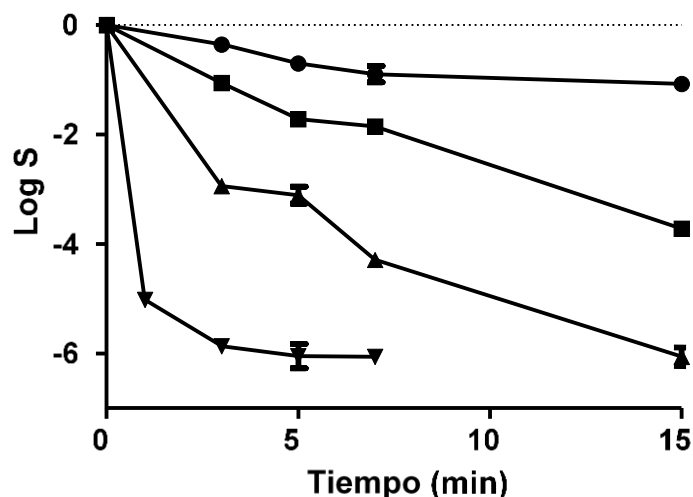


**Figura 10.** Ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull ( $\log_{10} b$ ), para ( $\square$ ) medio de referencia 0,5% NaCl y ( $\circ$ ) queso fresco.

#### **Efecto HHP sobre *Penicillium aurantiogriseum* en queso fresco.**

La figura 11 muestra los resultados del tratamiento por alta presión hidrostática en queso fresco de las esporas de *P. aurantiogriseum*. Como ocurrió en medio de referencia las esporas fueron más resistentes al tratamiento por altas presiones en queso fresco que las células de levadura. Para lograr una reducción en la carga inicial superior a 5 ciclos  $\log_{10}$  en las esporas de *P. aurantiogriseum* fue necesario incrementar la presión hasta los 400 MPa con tiempos superiores a 3 minutos. Al someter el queso fresco inoculado con las esporas a 300 MPa durante 3 min se observó una reducción en el recuento inicial de 1 ciclo

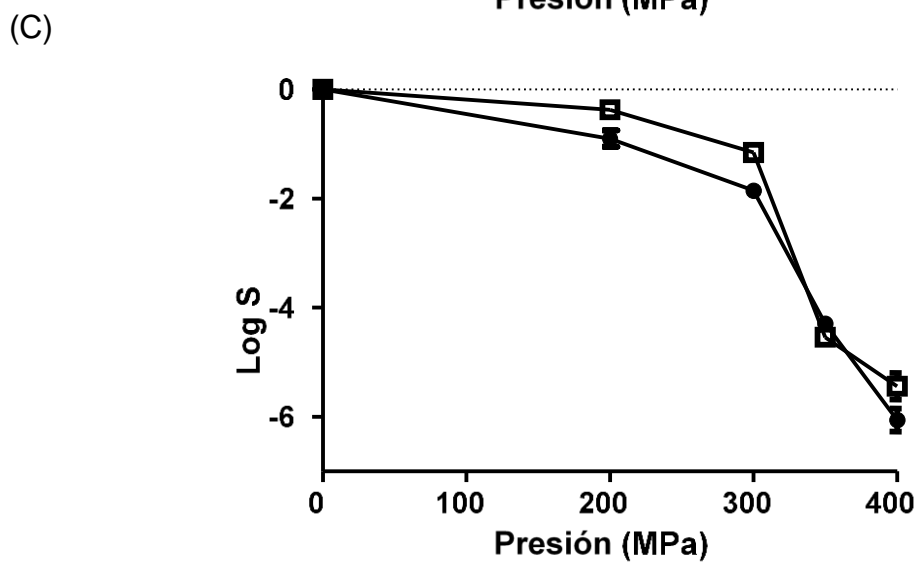
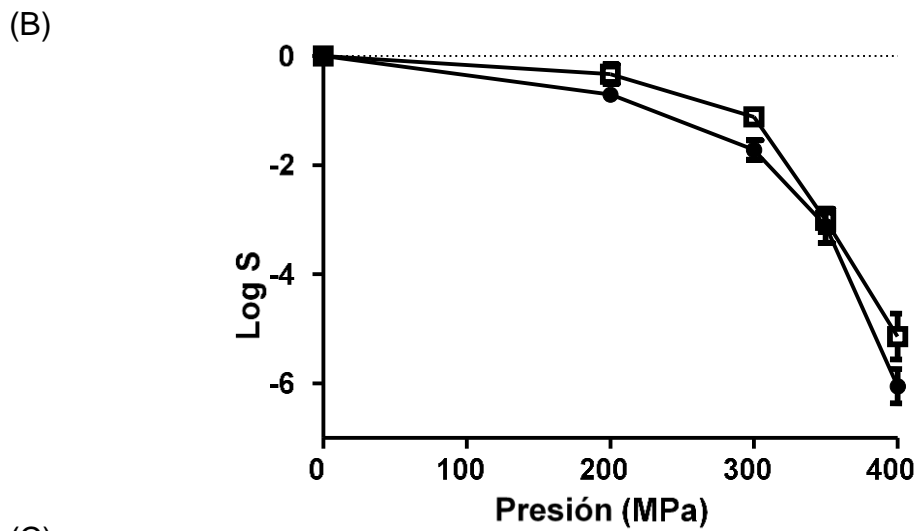
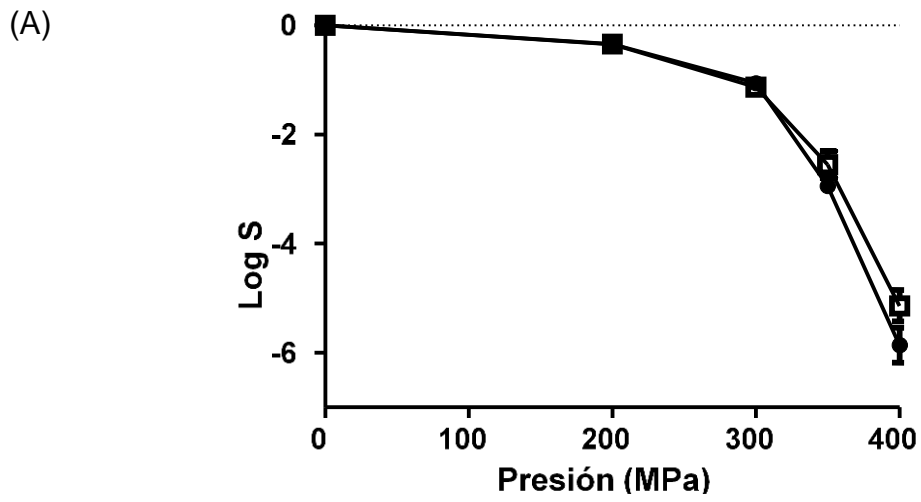
logarítmico. Un incremento en la presión hasta los 350 MPa durante 15 minutos causó una caída en la población inicial de 6,1 ciclos  $\log_{10}$ , aunque este es un tratamiento relativamente prolongado que puede producir modificaciones en las características iniciales del queso fresco. No obstante, con un nuevo incremento en la presión de tratamiento hasta los 400 MPa durante un tiempo relativamente bajo (3 min) se consiguieron niveles de inactivación de 5,9 ciclos  $\log_{10}$  en las esporas de *P. aurantiogriseum*. Incrementar el tiempo de tratamiento a 7 minutos a 400 MPa no produjo un incremento adicional apreciable en el nivel de inactivación de las esporas llegando hasta un máximo de 6,1 ciclos  $\log_{10}$ .



**Figura 11.** Inactivación de *P. aurantiogriseum* en queso fresco a diferentes tiempos de tratamiento, concentración de 0,5% NaCl y presiones (●) 200, (■) 300, (▲) 350, (▼) 400 MPa, pH: 5,35 y temperatura de tratamiento de 20 °C.

Por lo que se refiere al comportamiento de las esporas de *P. aurantiogriseum* inoculadas en los diferentes sustratos (agua de peptona, queso fresco), en el caso del queso fresco la inactivación de las esporas fue ligeramente superior a la lograda en el medio de referencia, agua de peptona, bajo los diversos tratamientos de HHP como se puede observar en la figura 12. No obstante, no

se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre cada uno de los medios evaluados.



**Figura 12.** Inactivación de *P. aurantiogriseum* en queso fresco a tiempos comunes de tratamiento (A) 3, (B) 5, (C) 7 minutos, en: (□) medio referencia agua peptona 0,5% NaCl, (●) queso fresco inoculado, pH: 5,35 y temperatura de tratamiento de 20 °C.

### **Modelización**

Como en el caso anterior, se procedió al ajuste de las curvas de supervivencia de *P. aurantiogriseum* tratada por HHP al modelo de función de distribución de Weibull, observándose un buen ajuste a dicho modelo. Los parámetros de ajuste al modelo se pueden observar en la tabla 6, donde el parámetro  $b$  del modelo de Weibull, presenta una tendencia a aumentar al incrementar la presión. Este comportamiento indica que las células mueren mas rápidamente a presiones elevadas como se aprecia también en las curvas de supervivencia.

Sin embargo, cabe señalar que no se observó una tendencia definida al comparar el valor del parámetro cinético  $b$  obtenido en los diferentes sustratos con los que se ha trabajado bajo la misma presión. Así como se observa que a las presiones de 200 y 350 MPa no se presentan diferencias entre los valores  $b$  obtenidos para cada uno de los sustratos, sí aparecen diferencias entre los valores de  $b$  bajo la misma presión para ambos sustratos a los tratamientos de 350 y 400 MPa, obteniéndose la máxima velocidad de inactivación para el tratamiento de 400 MPa en queso fresco. En cuanto a los valores del parámetro  $n$ , parámetro de forma, se observó que en todos los casos fue menor de 1, indicando la existencia de colas.

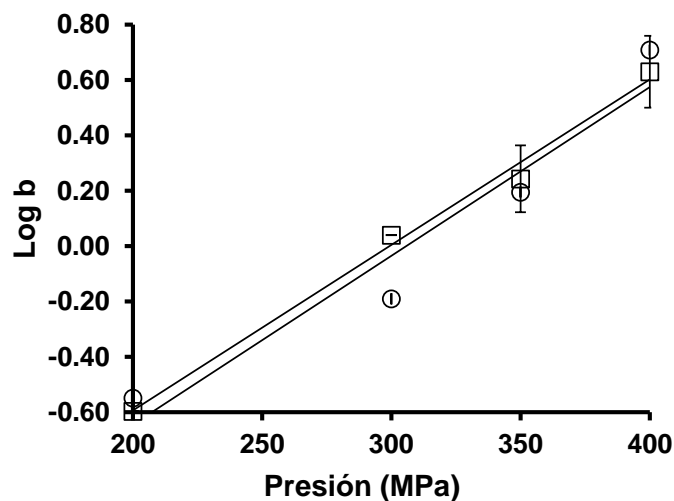
**Tabla 6.** Valores del parámetro  $b$  y  $n$  del modelo de Weibull, valores de  $R^2$ -ajustado y MSE en las curvas de supervivencia de *P. aurantiogriseum* a diferentes presiones en queso fresco.

Presión (MPa)	Medio	Modelo Weibull		$R^2$ - ajustado	MSE
		$b$	$n$		
200	0,5% NaCl	0,25 (0,10)*	0,21 (0,04)	0,990	0,00
	Queso fresco	0,28 (0,06)	0,51 (0,14)	0,941	0,08
300	0,5% NaCl	1,10 (0,07)	0,02 (0,01)	0,998	0,00
	Queso fresco	0,65 (0,05)	0,52 (0,11)	0,990	0,09
350	0,5% NaCl	1,75 (0,20)	0,41 (0,06)	0,956	0,12
	Queso fresco	1,57 (0,10)	0,50 (0,09)	0,989	0,16
400	0,5% NaCl	4,27 (0,14)	0,14 (0,03)	0,992	0,13
	Queso fresco	5,11 (0,11)	0,10 (0,00)	0,998	0,09

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

Para la obtención del parámetro  $z_p$  se ajustó el logaritmo del parámetro  $b$  a la presión tal y como se observa en la figura 13. Estos valores se calcularon de forma independiente para cada medio estudiado. Para el medio de referencia agua de peptona con un 0,5% NaCl, el valor de  $z_p$  obtenido fue de 166 MPa, mientras que para el queso fresco el valor  $z_p$  fue de 164 MPa. En este caso los valores de  $z_p$  no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) para los dos sustratos evaluados, por tanto para el caso específico de las esporas de *P. aurantiogriseum* el medio no afecta a los valores de  $z_p$ .





**Figura 13.** Ajuste lineal del logaritmo del parámetro  $b$  del modelo de Weibull ( $\log_{10} b$ ), para (□) medio de referencia 0.5% NaCl (○) queso fresco.

## CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que los tratamientos con Altas Presiones Hidrostáticas en torno a los 350 - 400 MPa y temperaturas iniciales moderadas de 20 °C son efectivos para controlar la presencia de microorganismos alteradores del queso fresco como *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum*. En cuanto al efecto de la concentración de cloruro sódico en el tratamiento con HHP, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de inactivación alcanzados por HHP para cada una de las concentraciones estudiadas (0; 0,1; 0,5; 0,8%) y para todos los tratamientos (Presión-tiempo). Por tanto, se puede concluir que en nuestro estudio la concentración de cloruro sódico presente en el medio de referencia agua de peptona no puede considerarse como un factor adicional de control para *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum* tratadas por HHP.

Cabe resaltar que los resultados de inactivación obtenidos bajo cada tratamiento de presurización dependieron directamente del microorganismo estudiado, ya

que las células de *R. glutinis* presentaron una menor resistencia a las HHP en comparación con las esporas de *P. aurantiogriseum*. En cuanto al efecto del sustrato de trabajo se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de  $b$  en el medio de referencia y el queso fresco, que es una matriz más compleja, obteniéndose una mayor reducción de la carga inicial en el medio de referencia para unas mismas condiciones de trabajo para *R. glutinis*.

El modelo de Weibull presentó un buen ajuste a los datos experimentales de inactivación tanto para el medio de referencia como para el queso fresco. Además de esto los parámetros cinéticos del modelo nos proporcionaron información sobre el comportamiento del microorganismo, su velocidad de inactivación frente a los diversos parámetros de estudio (Presión, tiempo) y tipo sustrato (%NaCl, queso fresco).

El presente estudio contribuye al estado del conocimiento en cuanto al futuro procesado por HHP de productos derivados lácteos produciendo suficientes reducciones logarítmicas en mohos y levaduras alteradores comúnmente presentes en estos productos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer al Instituto de investigación Alpina de Colombia, por aportar los fondos económicos necesarios para este estudio y al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) por sus instalaciones.

## REFERENCIAS

Amiali, M., Ngadi, M.O., Smith, J.P., Raghavan, G.S.V. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering* 79: 689–694.

Akdemir Evrendilek, G., Koca, N., Harper, J. W., Balasubramaniam V.M. (2008). High-Pressure Processing of Turkish White Cheese for Microbial Inactivation. *Journal of Food Protection* 71(1):102–108.

Barbosa- Cánovas, G.V., Gongora- Nieto, M., Pothakamury U., Swanson B. (1999). Preservation of foods with pulsed electric fields. 5-10, Academic Press, San Diego, USA.

Basak, S., Ramaswamy, H.S., Piette, J.P.G. (2002). High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3: 223–231.

Bigelow, W.D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal Infectious Diseases*, 29: 528–536.

Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F. (2005). Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Research International* 38: 151–157.

Carreño, J. M., Gurrea, M. C., Sampedro, F., Carbonell, J. V. (2011). Effect of high hydrostatic pressure and high-pressure homogenisation on *Lactobacillus plantarum* inactivation kinetics and quality parameters of mandarin juice. *European Food Research and Technology* 232(2): 265–274.

Chen, H. and Hoover, D. G. (2004). Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 269– 276.

Chevalier, D., Le Bail, A., M. Ghoul. (2001). Effects of high pressure treatment (100–200 MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle. *Food Research International* 34: 425–429.

Cheftel, J. C. (1995). Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation/revisión: Alta-presión, inactivación microbiológica y conservación de alimentos. *Food science and technology international* 1(2-3): 75-90.

Collado, J., Fernández A., Rodrigo, M., Camats, J., Martínez López, A. (2003). Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* 20: 545–548.

Coroller, L., Kan-King-Yu, D., Leguerinel, I. Mafart, P., Membré, J.M. (2012). Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation areas of *Listeria* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 152:139–152.

Donsì, F., Annunziata, M., Ferrar, G. (2013). Microbial inactivation by high pressure homogenization: Effect of the disruption valve geometry *Journal of Food Engineering* 115: 362–370.

Deeth, H. and Griffiths, M. W. (2010). Improving UHT processing and UHT milk products. Improving the safety and quality of milk. *Milk production and processing* 1: 302–329.

Devi, A.F., Liu, L.H., Hemar, Y., Buckow, R., Kasapis, S. 2013. Effect of high pressure processing on rheological and structural properties of milk–gelatin mixtures. *Food Chem* 141: 1328–1334.

Duranton, F., Guillou, S., Simonin, H., Chéret, R., Lamballerie M. (2012). Combined use of high pressure and salt or sodium nitrite to control the growth of endogenous microflora in raw pork meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16: 373–380.

Elez-Martinez, P., Suarez-Recio, M., Martin-Belloso, O. (2007). Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 78: 184–193.

Erkmen, O. (2001). Effects of high-pressure carbon dioxide on *Escherichia coli* in nutrient broth and milk. *International Journal of Food Microbiology* 65(1): 131–135.

Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M., Ocio, M.J., Martínez, A. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology* 77:147–153.

Hayakawa, K., Ueno, Y., Nakanishi, S., Miyano, Y., Kikushima, S., Shou. S. (1994). High pressure treatment for preservation of shiromiso, p. 320– 327. In R. Hayashi, S. Kunigi, S. Shimada, and A. Suzuki (ed.), High pressure bioscience. San-Ei Suppan Co., Kyoto, Japan.

Huang, H.W., Lung, H.M., Yang, B.B., Wang, C.Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control* 40: 250–259.

HHS and USDA. (2010). Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2010, to the Secretary of Agriculture and the Secretary of Health and Human Services. Washington, DC: USDA/ARS. <http://www.cnpp.usda.gov/Publications/DietaryGuidelines/2010/DGAC/Report/2010DGACReport-camera-ready-Jan11-11.pdf> (accessed March 7, 2013).

Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2004). Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and environmental microbiology* 70(4): 2013–2020.

Moschopoulou, E., Anisa, T., Katsaros, G., Taoukis, P., Moatsou, G. (2010). Application of high-pressure treatment on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora

throughout ripening. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4): 543–550.

Igual, M., Sampedro, F., Martínez-Navarrete, N., Fan, X. (2013). Combined osmodehydration and high pressure processing on the enzyme stability and antioxidant capacity of a grapefruit jam. *Journal of Food Engineering* 114: 514–521.

Koseki, S. and Yamamoto, K. (2007). Water activity of bacterial suspension media unable to account for the baroprotective effect of solute concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 115: 43–47.

Koseki, S., and Yamamoto, K. (2014). High Pressure Microbial Inactivation: Modelling and its. Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques. Florida, USA: CRC Press, 1.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E.H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21: 805–815.

Lin, H-M., Cao, N., Chen, L.F., (1994). Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Science* 59: 657–659.

Mohamed, H.M.H., Diono, B.H.S., Yousef, E.Y. (2012). Structural changes in *Listeria monocytogenes* treated with gamma radiation, pulsed electric field and ultra-high pressure. *Journal Food Safety* 32: 66–73.

Molina-Guiterrez, A., Rademacher, B., Gänzle, M.G., Vogel, R.F. (2002). Effect of sucrose and sodium chloride on the survival and metabolic activity of *Lactococcus lactis* under high-pressure conditions. In: Hayashi, R. (Ed.), Trends in Highpressure Bioscience and Biotechnology. Elsevier, Amsterdam, pp. 295–302.

- Moody, A., Marx, G., Swanson, B. G., Bermúdez-Aguirre, D. (2014). A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food Control* 37: 305–314.
- Okpala, C.O.R., Piggott, J. R., Schaschke, C.J. (2010). Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 61–67.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Kelly, A.L., Beresford, T.P., Murphy, P.M. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4890–4896.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welte-Chanes, J., Swanson, B. G. (1997). Effect of water activity on high hydrostatic pressure inhibition of *Zygosaccharomyces bailli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:417–420.
- Peleg, M. (2000). Microbial survival curves-the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International* 33: 531–538.
- Pina-Pérez, C., Rodrigo Aliaga, D., Saucedo-Reyes, D., Martínez-López, A. (2007). Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakasaki* in infant formula milk. *Journal of Food Protection* 70: 2281–2289.
- Pina-Pérez, C., Silva-Angulo, A.B., Rodrigo Aliaga, D., Martínez-López, A. (2012). A preliminary exposure assessment model for *Bacillus cereus* cells in a milk based beverage: Evaluating High Pressure Processing and antimicrobial interventions. *Food Control* 26: 610-613.
- Polydera, A.C., Stoforos N.G., Taoukis, P.S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60: 21–29.

Ratphitagsanti, W., Ahn, J., Balasubramaniam, V.M., Yousef, A.E. (2009). Influence of pressurization rate and pressure pulsing on the inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores during pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Protection* 72(4): 775–782.

Reij, M.W., Den Aantrekker, 2004. E.D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol* 91: 1–11.

Rodrigo, D., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M. (2003). Pectinmethylesterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 66:2336–2342.

Rosengrena, Å., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *Int J Food Microbiol* 144: 263–269.

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M. (2006). Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice–milk beverage. *European Food Research and Technology* 223:30–34.

Singh, R. R. B., Ruhil, A. P., Jain, D. K., Patel, A. A., Patil, G. R. (2009). Prediction of sensory quality of UHT milk—a comparison of kinetic and neural network approaches. *Journal of food engineering* 92(2): 146–151.

Sopelana, P., Pérez-Martínez, M., López-Galilea, I., de Peña, M. P., Cid, C. (2013). Effect of ultra high temperature (UHT) treatment on coffee brew stability. *Food Research International* 50(2): 682–690.

Torres, E.F., Bayarri, S., Sampedro, F., Martinez, A., and Carbonell, J.V. (2008). Improvement of the Fresh Taste Intensity of Processed Clementine Juice by Separate Pasteurization of its Serum and Pulp. *Food Science and Technology International* 14(6): 525–529.



- Torres, E.F., González –Martínez, G., Klotz, B., Rodrigo, D., Martínez, A. (2014). High Pressure Treatment in Foods. *Foods* 3(3): 476–490.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal Food Microbiology* 74: 139–159.
- Van Opstal, I., Vanmuysen, S.C.M., Michiels, C.W., (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *Int. J. Food Microbiol* 88: 1–9.
- Voigt, D. D., Chevalier, F., Qian, M. C., K, A. L. (2010). Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 68–77.
- WHO World Health Organization (2013). Mapping salt reduction initiatives in the WHO European Region. WHO Regional Office for Europe. Copenhagen, Denmark. <http://www.who.cz/attachments/article/91/Mapping-salt-reduction-initiatives-in-the-WHO-European-Region-final.pdf> (accessed September 6, 2014).
- Yang, B., Shi, Y., Xia, X., Xi, M., Wang, X., Ji, B. (2012). Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control* 28: 273–278.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. S., Linton, R.H., Sheard, M.A. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology* 16:269–279.
- Zook, C. D., Parish, M. E., Braddock, R. J., Balaban, M. O. (1999). High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices. *Journal of Food Science* 64(3): 533-535.

# CAPÍTULO II

## Efecto del cloruro sódico (NaCl) en la inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) de bacterias patógenas y alteradoras.

Torres, E.F<sup>a</sup>., González-M, G<sup>b</sup>., Klotz, B<sup>b</sup> Cunha, L.M<sup>c</sup> & Martínez, A<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos  
Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico  
46980 Paterna (Valencia)  
Spain.

<sup>b</sup> Alpina Research Institute (IAI), Alpina Productos Alimenticios S.A  
Edificio Corporativo Km 3 vía  
251001 Briceño-Sopó, Sopó (Cundinamarca), Colombia

<sup>c</sup> GreenUP/CITAB,UP, DGAOT Faculdade de Ciências, Universidade do Porto,  
Campus Agrário de Vairão,  
Rua Padre Armando Quintas, 7, 4486-661 Vairão, Portugal

Torres, E.F., González-M, G., Klotz, B, Cunha, L.M. Martínez, A. 2016. Efecto del Cloruro sódico (NaCl) en la inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* en medio de referencia. Enviado a: Journal of Food Microbiology

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de cloruro sódico (0; 0,1; 0,5; 0,8%) en la inactivación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 y *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 durante el tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) (de 250 a 550 MPa) en combinación con temperaturas moderadas de procesamiento (20 °C), en agua de peptona como medio de referencia. La pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes* y *Ps. fluorescens* incrementó significativamente a medida que se disminuyó la concentración de cloruro sódico (NaCl) y se incrementó tanto la presión como el tiempo de tratamiento, obteniendo a concentraciones de 0 y 0,8% NaCl reducciones entre 6,0 y 4,6 ciclos  $\log_{10}$  respectivamente, con un tratamiento a 450 MPa a 20 °C por 1 min. En cuanto a la inactivación de *S. aureus* la máxima reducción obtenida para 0 y 0,1% de NaCl fue 3,6 ciclos  $\log_{10}$ , un incremento en la concentración de NaCl dio lugar a una ligera protección del microorganismo obteniéndose una menor inactivación, aproximadamente 2,2 ciclos  $\log_{10}$ , a la presión de 550 MPa durante 7 minutos y 20 °C, por tanto este microorganismo demostró ser más resistente a los tratamientos por HHP que *L. monocytogenes*. Los resultados obtenidos en este estudio manifiestan una cierta protección de las concentraciones más elevadas de NaCl frente al tratamiento por altas presiones.

## Introducción

Actualmente existe una tendencia hacia la reducción de determinados componentes en los alimentos como son el cloruro sódico, grasa o azúcar, dado el impacto que estos tienen en la salud del consumidor, favoreciendo el

desarrollo de determinadas enfermedades. El consumo elevado de cloruro sódico (NaCl) se ha relacionado con el incremento en la presión sanguínea y, por tanto, un aumento en las enfermedades cardiovasculares. Asimismo, existen estudios que relacionan indirectamente la ingesta de NaCl con la obesidad, osteoporosis y el incremento del riesgo de formar piedras en el riñón. Por tal motivo en los últimos años varios organismos gubernamentales a nivel mundial han realizado recomendaciones acerca de la ingesta diaria máxima de cloruro sódico en alimentos (WHO, 2007; HHS & USDA, 2010a). Las guías de dietistas de Estados Unidos, 2010 HHS y USDA, 2010b recomiendan una reducción de la ingesta de sodio a menos de 2.300 mg o 1.500 mg por día. Estos valores dependen directamente de la edad y de las características propias de cada individuo.

El NaCl se utiliza con frecuencia en la industria alimentaria debido a que presenta varias funciones tecnológicas en los alimentos relacionadas con el sabor, interacción con proteínas, modificación de la humedad, control microbiano y enzimático (Breslin & Beauchamp, 1995; Gillette, 1985; Liem et al. 2011). Una reducción en el contenido total de NaCl podría presentar un problema de seguridad alimentaria, ya que se podría producir un mayor crecimiento de microorganismos en un periodo de tiempo relativamente corto, como sería el caso de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, causa de importantes toxiinfecciones alimentarias.

Según se publicó en 2011 por el "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) hay una media anual de 1.455 hospitalizaciones en EEUU de las cuales se producen una media de 255 muertes por *L. monocytogenes*. Estos brotes se atribuyen al consumo de alimentos mínimamente procesados (queso, vegetales,

productos cárnicos). Scallan *et al.* (2011) indicaron que *S. aureus* causa aproximadamente 241.188 enfermedades, 1.064 hospitalizaciones y 6 muertes por año. Este microorganismo se caracteriza por contaminar diversos alimentos de consumo diario (leche, queso, productos de pastelería, huevos).

La reducción en el nivel de sal de algunos alimentos probablemente debería ir acompañado de la incorporación de alguna medida de control adicional que reduzca la carga microbiana facilitando de esta manera su conservación y el mantenimiento de su vida útil. El tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) se ha vislumbrado como una tecnología apropiada para la inactivación de microorganismos alteradores y patógenos (López-Pedemonte *et al.* 2007; Gao *et al.* 2006; Myers *et al.* 2013) manteniendo las características intrínsecas de calidad (sabor, color, vitaminas, aroma) de alimentos frescos, tratados a la vez que incrementa la vida útil del producto en refrigeración (Torres *et al.* 2015; Garriga *et al.* 2004; Pereda *et al.* 2007). Sin embargo, existen varios factores intrínsecos de los alimentos que pueden influir directamente sobre la efectividad del tratamiento por HHP (cloruro sódico, azúcares, grasas, pH) (Van Opstal *et al.* 2003; O'Flynn *et al.* 2014; Oxen & Knorr 1993; Goh *et al.* 2007; Seman *et al.* 2002; Aymerich *et al.* 2005). De acuerdo a estos trabajos, parece que variaciones en la concentración de NaCl presente en los alimentos pueden llegar a producir cambios significativos tanto en las propiedades fisicoquímicas como en la inactivación microbiana.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de NaCl y las HHP en combinación con temperaturas moderadas de procesamiento (20 °C) sobre microorganismos patógenos (*L.monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) y

alteradores (*Pseudomonas fluorescens* ATCC13525) que pueden estar presentes en queso fresco.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Medio de tratamiento.**

Se utilizó agua de peptona al 0,1% (Scharlab Chemie S. A. Barcelona, España). Los estudios se realizaron con concentraciones de cloruro de sodio de 0% (control), 0,1; 0,5 y 0,8% (estas concentraciones son típicas de productos con bajo contenido en sal). El pH de los medios fue de 6,5, medido mediante un pHmetro modelo GLP-21 (Crison, España).

### **Cultivos microbianos**

Los microorganismos liofilizados congelados proporcionados por la Colección Española de Cultivos tipo *L. monocytogenes* ATCC 19114, *S. aureus* ATCC 13565 y *Ps. fluorescens* ATCC13525 se rehidrataron en 15 mL de "Tryptic Soy Broth" (TBS, Scharlab Chemie Barcelona, Spain) después de 20 minutos a 37 °C *L. monocytogenes* y *S. aureus* y 26 °C *Ps. fluorescens*, se transfirieron a 500 mL Tryptic Soy Broth (TSB) y se incubaron *L. monocytogenes* y *S. aureus* durante 12h a 37 °C, y *Ps. fluorescens* durante 22h a 26 °C en agitación a 70 r.p.m hasta conseguir las células en fase estacionaria. El volumen de 500 mL se centrifugó dos veces a 5000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante resultante se descartó, el precipitado generado tras cada una de las centrifugaciones se resuspendió en 100 mL de caldo TSB. Después de la segunda centrifugación el contenido se transfirió a crioviales con capacidad de 2 mL depositando 1 mL de la suspensión celular y 1 mL de caldo TSB con glicerol

al 20%. Inmediatamente se almacenaron a -80 °C. La concentración final en los crioviales fue de  $1 \times 10^8$  CFU/mL.

### **Tratamiento HHP.**

Para cada tiempo y presión se utilizaron tres muestras independientes situadas en bolsas de polietileno metalizadas y termoselladas (MULTIVAC, Thermosealer). La temperatura de tratamiento para el estudio fue de 20 °C, obteniendo una temperatura final máxima de 38 °C a una presión de 550 MPa.

Antes de cada tratamiento de HHP, se inoculó cada uno de los medios de referencia conteniendo las diferentes concentraciones de NaCl con *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Ps. fluorescens* por separado, hasta una concentración final aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Se depositaron 10 mL del medio de referencia inoculado en bolsas de polietileno metalizadas y se termosellaron inmediatamente. Las presiones utilizadas para los tratamientos fueron de 200 a 550 MPa por un tiempo entre 0 y 20 minutos. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

### **Análisis microbiológico**

Tras el tratamiento con HHP, se tomaron las muestras del medio de referencia y se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona estéril tamponada al 0,1% (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España). Estas diluciones se sembraron en "Tryptic Soy Agar" TSA (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24h para *L. monocytogenes* y *S. aureus* y 48h a 26 °C para *Ps. fluorescens*. Una vez terminada la incubación se llevó a cabo un

recuento de células viables en las placas que presentaron entre 30-300 colonias. La reducción microbiana por el tratamiento con HHP se expresó como  $\text{Log}_{10} N/N_0$ , donde  $N$  correspondía al número de células viables después del tratamiento por HHP y  $N_0$  era el número inicial de microorganismos en el control no tratado.

### **Modelización.**

Los datos de supervivencia se ajustaron a los siguientes modelos:

#### **Modelo Geeraerd et al. (2000)**

$$N = (N_0 - N_{res}) \cdot e^{-k_{max}t} + N_{res} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde  $N$  representa la densidad celular;  $N_0$  la carga inicial microbiana,  $N_{res}$  la carga residual después de recibir cualquier tipo de tratamiento,  $k_{max}$  es la tasa de inactivación específica (1/min) y se define como la pendiente de la parte exponencial de la curva de supervivencia,  $t$  es el tiempo de tratamiento expresado en minutos.

#### **Función de Distribución modificada de Weibull.**

$$\log \frac{N}{N_0} = S = -bt^n \quad \text{Ecuación 2.}$$

Peleg & Coleg, (1998) propusieron este modelo, donde  $\text{Log } N/N_0$  frente al tiempo ( $t$ ) es el logaritmo decimal de  $S$ ,  $S$  es la fracción de supervivientes,  $t$  es el tiempo de tratamiento expresado en minutos,  $b$  es el parámetro de escala y se puede considerar como el parámetro cinético y  $n$  es el parámetro de forma, cuyo valor depende de la forma de la curva de supervivencia. Cuando el valor



de  $n < 1$ , las curvas de supervivencia presentan colas; cuando el valor de  $n > 1$ , las curvas de supervivencia presentan hombros. En el caso de que el valor de  $n=1$ , la cinética de muerte es log-lineal. Para el ajuste de los datos de este trabajo se ha utilizado  $1/b$  siendo este el inverso del parámetro  $b$ , para que la apreciación sea de disminución del parámetro a medida que aumenta la inactivación.

El ajuste de los modelos se validó usando el parámetro Accuracy factor ( $A_f$ ) (Ecuación 3) (Ross, 1996) y el ajuste dado por el modelo  $R^2$ .

$$A_f = 10^{\frac{\sum |\text{Log}(X_p/X_o)|}{n}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde  $n$  es el número de valores observados, los  $X_p$  son valores ajustados y  $X_o$  son los valores observados. Los valores de  $A_f$  cercanos a 1 nos indican un mejor ajuste del modelo a los valores experimentales.

### **Análisis estadístico**

Para evaluar el efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas y la temperatura en la inactivación de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Ps. fluorescens* se realizó un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias con un nivel de confianza del 95%. Todos los datos estadísticos se han analizado mediante el programa informático Statgraphics centurion XV, StatPoint, Inc.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

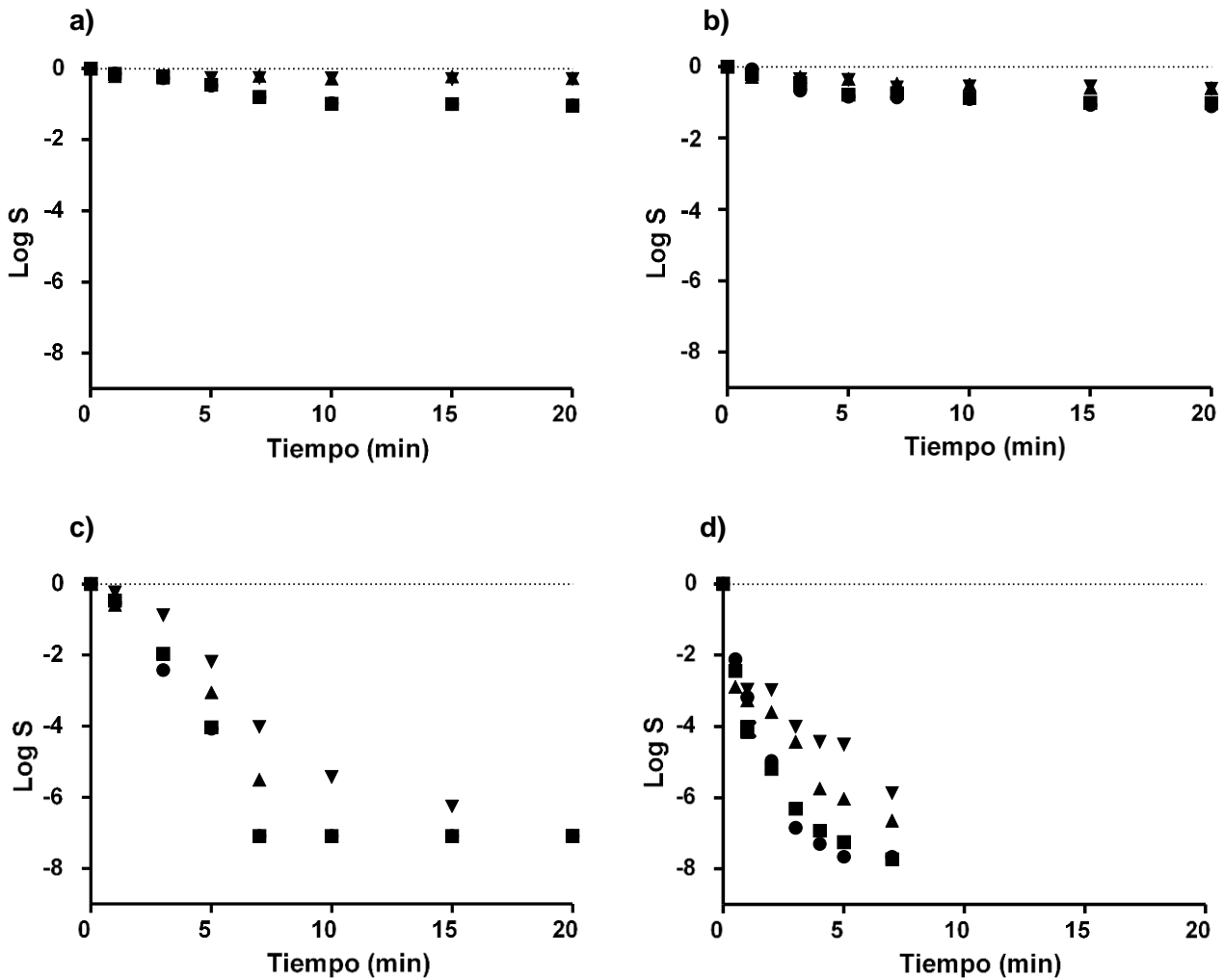
### Inactivación microbiana por HHP

Los resultados de inactivación de *L. monocytogenes* por HHP en el medio de referencia agua de peptona con diferentes concentraciones de NaCl (0; 0,1; 0,5; 0,8%) se muestran en la figura 1. En general se observó que, independientemente de la concentración de NaCl presente en el medio, solo se obtienen niveles de inactivación apreciables a partir de los 350 MPa hasta obtener una inactivación superior a 7 ciclos logarítmicos a 400 MPa (Figura 1). Los resultados obtenidos a 350 MPa por 15 min a 20 °C con *Listeria monocytogenes* a las distintas concentraciones de NaCl indican una reducción máxima de 7 ciclos  $\log_{10}$  para la concentración de 0% de NaCl, mientras que para la mayor concentración de cloruro sódico (0,8%) se obtuvo una reducción de 6,3 ciclos  $\log_{10}$  en la carga inicial inoculada. A 400 MPa se observó un comportamiento similar en relación a la presencia de distintas concentraciones de cloruro sódico. Wuytack et al (2002) obtuvieron una reducción máxima de *Listeria innocua* (sustituto de *Listeria monocytogenes*) de aproximadamente 3,5 ciclos logarítmicos en tampón fosfato potasio (PBS) con pH 7,0 y 8,4 g/l NaCl con un tratamiento de 350 MPa por 15 min a 20 °C. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo, todo parece indicar que existe un efecto protector de la concentración de cloruro sódico en el nivel de inactivación tanto de *Listeria monocytogenes* como de su sustituto. A medida que aumenta la concentración de cloruro sódico disminuye el número de reducciones decimales obtenido. Por otro lado se observa una clara diferencia entre la respuesta de la *Listeria monocytogenes* y la *Listeria innocua* frente a una misma intensidad de tratamiento. *Listeria innocua*, de acuerdo a lo publicado

por Wuytack et al (2002), parece más resistente. Este comportamiento se puede deber a las características propias de las cepas utilizadas y del medio utilizado en el tratamiento. Igualmente cabe resaltar que varios estudios indican la existencia de variaciones en resistencia de los microorganismos a las HHP (Torres et al. 2015; Alpas et al. 1999). El resultado de comparar ambas cepas de listeria nos lleva a pensar que quizá no siempre *L. innocua* es un buen sustituto de la *L. monocytogenes*, aunque en este caso al ser *L. innocua* más resistente, su uso como sustituto para definir los procesos de conservación sería conservador y no pondría en riesgo la seguridad alimentaria.

En cuanto al efecto de la concentración de NaCl sobre la inactivación de *L.monocytogenes*, las diferencias obtenidas en la reducción microbiana para los medios con mayores concentraciones de NaCl podrían deberse a la protección que ejerce el incremento de concentración de sólidos solubles en el medio de referencia tal como han indicado otros autores (Goh et al. 2007; Koseki & Yamamoto (2007). Este resultado contrasta con el obtenido en el capítulo anterior para mohos y levaduras, en ese caso la concentración de NaCl no producía ningún efecto baroprotector.

Resumiendo, se puede decir que tanto las diferentes concentraciones de NaCl presentes en el medio de referencia, como la presión y el tiempo afectaron de forma significativa ( $P < 0,05$ ) a la inactivación de *Listeria monocytogenes*.



**Figura 1.** Curvas de supervivencia para *L. monocytogenes* en medio de referencia a concentraciones (●) 0; (■) 0,1; (▲) 0,5; (▼) 0,8 % NaCl y presiones de (a) 200; (b) 300; (c) 350 y (d) 400 MPa y temperatura inicial 20 °C.

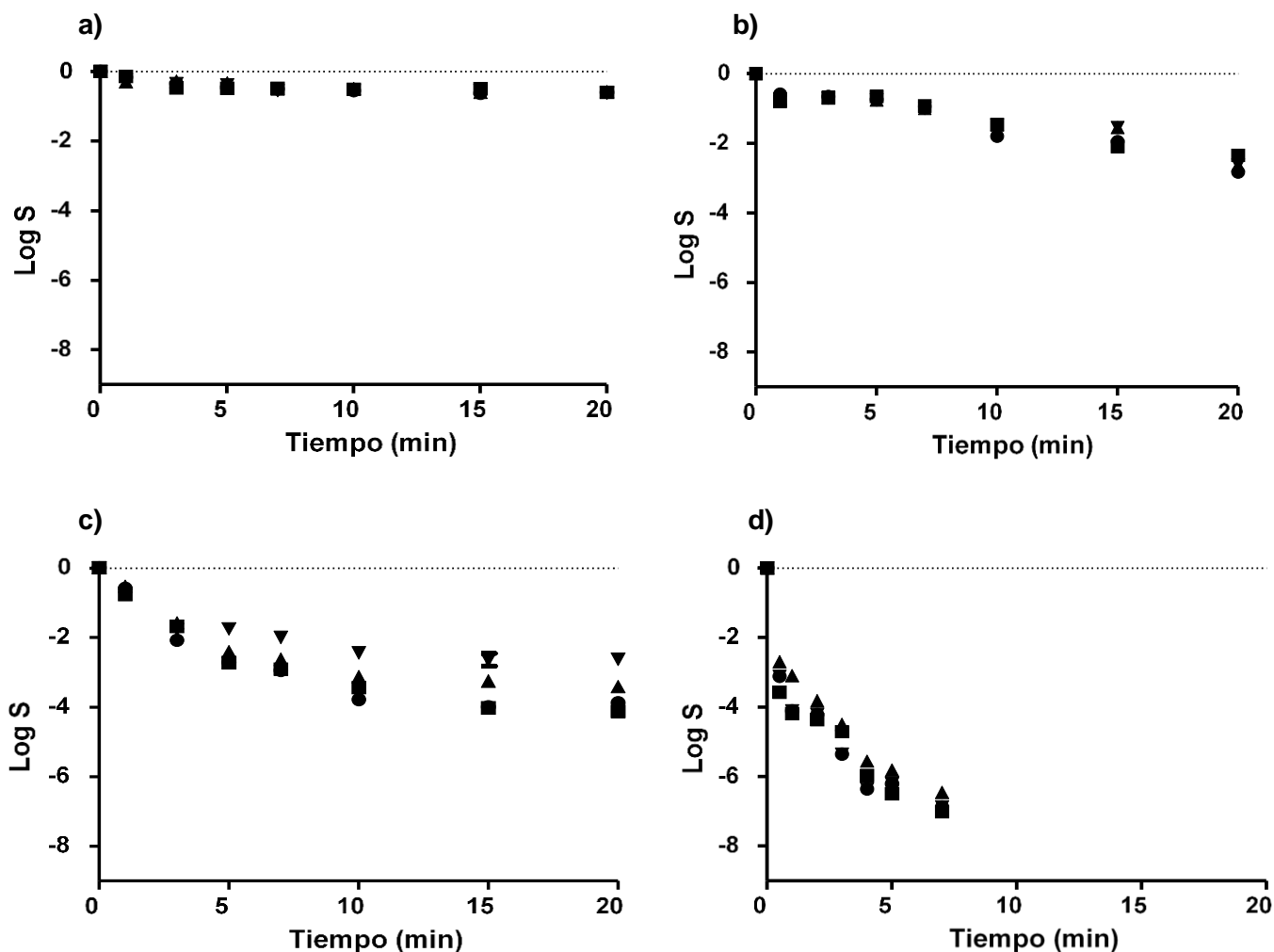
Respecto a *Ps. fluorescens* los resultados obtenidos se pueden apreciar en la figura 2. Los datos experimentales para *Ps. fluorescens* presentaron un comportamiento similar al descrito anteriormente para *L. monocytogenes*. Sin embargo, cabe destacar que a presiones de 200 y 300 MPa no se observan grandes diferencias entre cada una de las concentraciones de figura 2 (a, b), consiguiéndose una inactivación máxima de entre 0,5 y 2 ciclos  $\log_{10}$  respectivamente a un tiempo de tratamiento de 15 min. Incrementos en la

intensidad de la presión se tradujeron en reducción en la carga microbiana inoculada. Nuevamente mayores concentraciones de cloruro de sodio en el medio de referencia supusieron una ligera protección del microorganismo frente a los tratamiento por HHP, esto se observó para las presiones superiores a 350 MPa. Las mayores reducciones en la carga inicial para la presión de 350 MPa se obtuvieron a partir de los 10 min de tratamiento y para las concentraciones de 0; 0,1 y 0,5% de NaCl, con una reducción máxima de unos 3,2 ciclos logarítmicos. Cabe destacar que en el medio de referencia que contenía un 0,8% de NaCl la efectividad del tratamiento por HHP disminuyó hasta obtener 2,5 ciclos de la carga inoculada. Los resultados experimentales obtenidos para el tratamiento de 200 MPa durante 15 min a 20 °C fueron inferiores a lo publicado por Wuytack et al. (2002), donde se obtuvo una reducción máxima de 6 ciclos  $\log_{10}$  para *Ps. fluorescens* en el medio PBS para el mismo tratamiento. Sin embargo, un incremento en la presión a 400 MPa y tiempos inferiores a 5 min permitieron obtener igualmente estos niveles de inactivación.

Según lo publicado por varios autores (Oxen & Knorr, 1993; Molina-Höppner et al. 2004; Takahashi et al.1993), un incremento en las concentraciones molares (0,1 a 4M) de glucosa, fructosa, sucrosa y cloruro sódico en agua desionizada generaron un efecto baroprotector al tratar *Escherichia coli*, *Rhodotorula rubra*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*. Este efecto de baroprotección se atribuyó principalmente a la contracción de la membrana, lo que genera un engrosamiento cambiando el comportamiento de fluidez y transporte iónico de la misma.

A 400 MPa no se observaron diferencias entre las concentraciones de 0; 0,1; 0,5% NaCl, obteniéndose una reducción máxima de 5 unidades logarítmicas a

partir de los 4 min. Para obtener las mismas reducciones logarítmicas a la concentración de 0,8% de NaCl fue necesario aumentar el tiempo de tratamiento hasta los 7 min sin incrementar la presión.



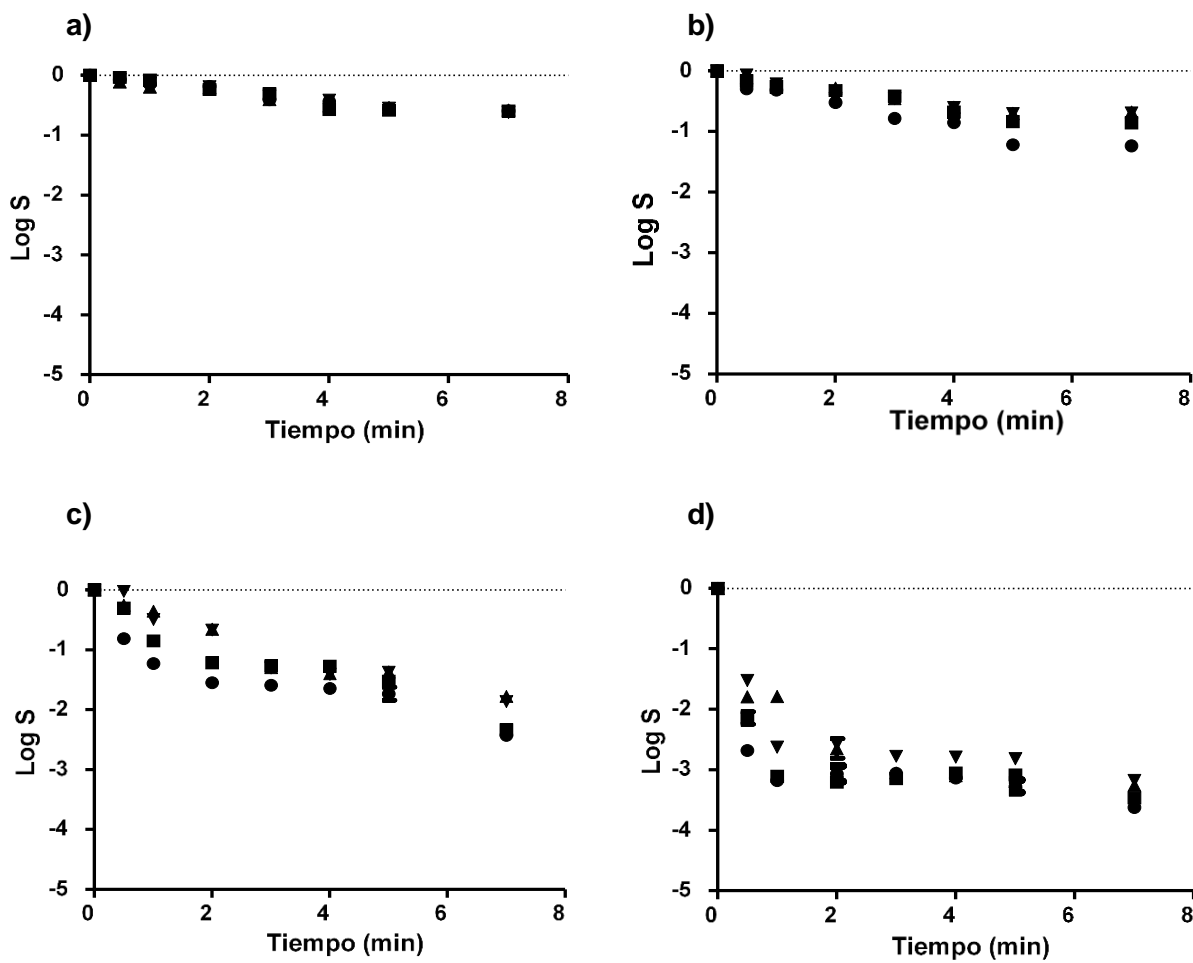
**Figura 2.** Curvas de supervivencia para *Ps. fluorescens* en medio de referencia a concentraciones (●) 0; (■) 0,1; (▲) 0,5; (▼) 0,8 % NaCl a presiones de (a) 200; (b) 300; (c) 350 y (d) 400MPa y temperatura inicial 20 °C.

La figura 3 muestra las curvas de supervivencia para *S. aureus*. Este microorganismo presentó una mayor resistencia a la presión que la obtenida para *L. monocytogenes* y *Ps. fluorescens*. El mayor nivel de inactivación se

consiguió a 550 MPa después de 7 minutos de tratamiento. Diversos autores han estudiado el comportamiento y resistencia de *S. aureus* en medios de referencia tratados por HHP (López-Pedemonte et al. 2007; O'Reilly et al. 2000; Arqués et al. 2005; Syed et al. 2014). Alpas et al. (1999) observaron una gran variación en los resultados obtenidos para este microorganismo dependiendo de las cepas utilizadas, con variaciones de entre 0,7 y 7,8 ciclos  $\log_{10}$  de inactivación a 345 MPa por 5 min a 25 °C en medio peptona al 1%. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos en el presente estudio produjeron una reducción de 0,3 ciclos  $\log_{10}$  a 350 MPa por 5 min para las diferentes concentraciones de NaCl, lo que parece indicar que la cepa utilizada tiene una mayor resistencia y pone de manifiesto la importancia de la cepa en los estudios cinéticos de inactivación. Para observar reducciones significativas es necesario evaluar los resultados a partir del tratamiento a 400 MPa durante 7 min, donde se alcanzó un ligero descenso en la población inicial inoculada (0,6 ciclos logarítmicos) para todas las concentraciones de NaCl estudiadas (Figura 3a). Al incrementar la presión a 450 MPa se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a partir de los 3 min de tratamiento, obteniéndose la mayor inactivación microbiana en el medio al 0% NaCl (control) 1,2 ciclos logarítmicos, frente a los aproximadamente 0,7 ciclos logarítmicos obtenidos para el resto de concentraciones. Estos resultados son similares a los publicados por Cebrián et al. (2010) al tratar diversas cepas de *S. aureus* en tampón citrato fosfato a 450 MPa consiguiendo reducciones que variaron de 0,1 a 0,8 ciclos logarítmicos con 10 min de tratamiento.

Al aumentar la presión de trabajo hasta los 500 MPa se observó un comportamiento similar al descrito anteriormente. Sin embargo, las diferencias entre cada uno de los medios que contenían cloruro sódico se presentaron a partir

del tiempo de tratamiento de 0,5 min entre el medio sin cloruro sódico (control) y las diversas concentraciones, 0,1; 0,5 y 0,8%, dando lugar a diferencias en la reducción microbiana de entre 0,5 y 0,8 ciclos logarítmicos. La mayor reducción lograda para *S. aureus* (3,5 ciclos logarítmicos) se alcanzó a los 550 MPa a un tiempo superior a 5 min a las concentraciones de 0 y 0,1% de NaCl. Las diferencias más notables en el nivel de reducción microbiana para cada una de las concentraciones se obtuvieron a tiempos iguales o inferiores a 2 min. Un aumento en el tiempo de tratamiento hizo que disminuyeran ligeramente las diferencias entre concentraciones, sin embargo en medio de referencia con 0,8% de NaCl se produjo la máxima protección de *S. aureus* frente a las HHP.



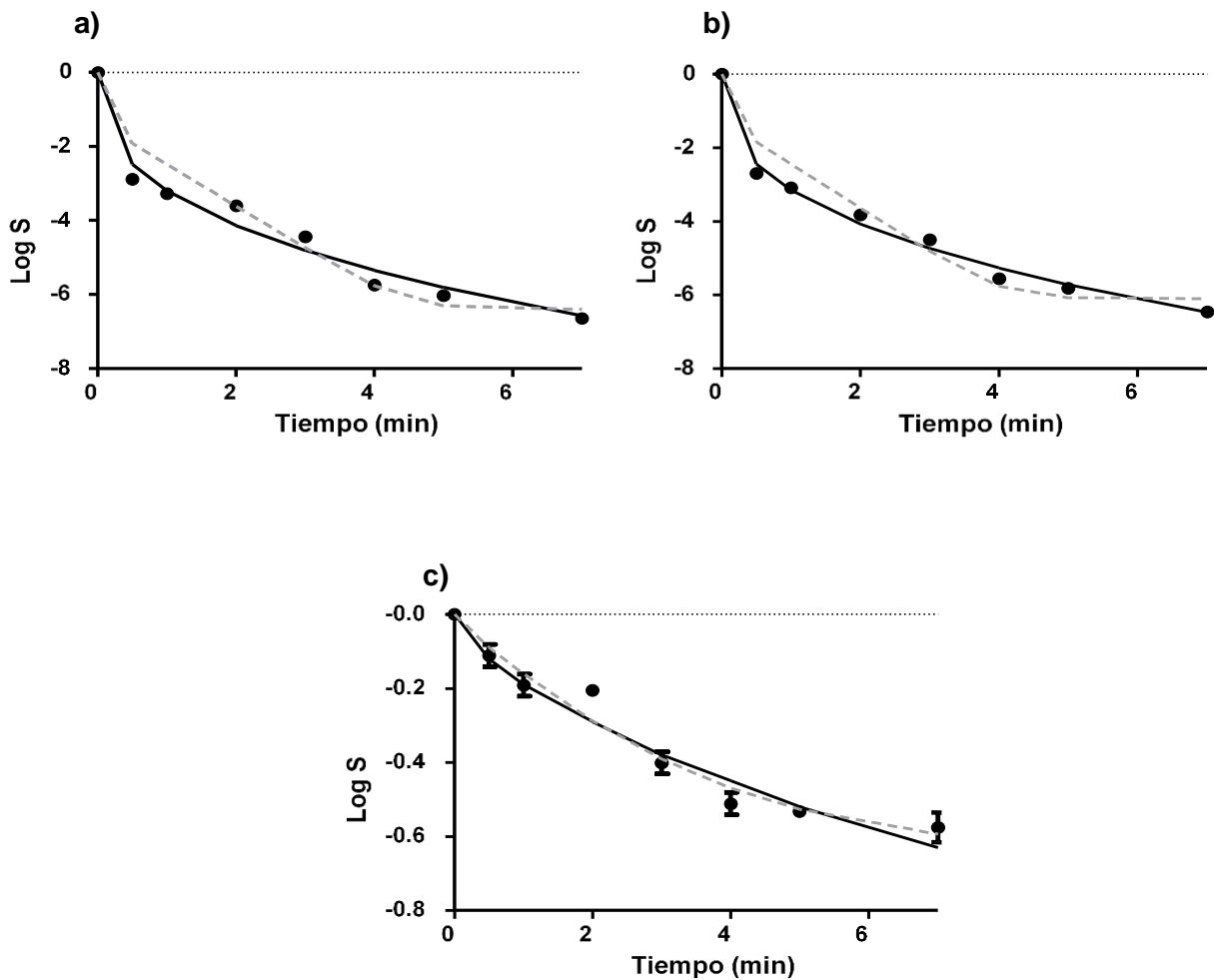
**Figura 3.** Curvas de supervivencia para *S. aureus* en medio de referencia a



concentraciones (●) 0; (■) 0,1; (▲) 0,5; (▼) 0,8 % NaCl y presiones de (a) 400; (b) 450; (c) 500 y (d) 550 MPa y temperatura inicial 20 °C. (Datos menores a 400 MPa no son presentados)

### **Modelización matemática**

Las curvas de supervivencia a las HHP para *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens* y *S. aureus* obtenidas bajo las diferentes concentraciones de NaCl presentaron colas como se puede observar en la figura 4. En dicha figura se puede ver un ejemplo de ajuste a los modelos descritos en materiales y métodos para la presión de 400 MPa y una concentración de 0,5% de NaCl, partiendo del tiempo 0. Tanto el modelo de Weibull como el de Geeraerd fueron seleccionados teniendo en cuenta el comportamiento experimental de los microorganismos y la bibliografía consultada (Geeraerd et al. 2000; Pina-Pérez et al. 2012; Donsì et al. 2013), donde se indica que estos tipos de modelos son adecuados para la descripción del comportamiento microbiano bajo el efecto de las HHP en curvas de supervivencia que presentan tanto hombros como colas.



**Figura 4.** Ejemplo de ajuste a los modelo de Weibull (-) y Geeraerd (--) para las curvas de inactivación de *L. monocytogenes* (a), *Ps. fluorescens* (b), *S. aureus* (c) bajo presión de 400 MPa con 0,5% de NaCl.

En las tablas 1, 2 y 3 se pueden observar los valores de los parámetros cinéticos para los modelos seleccionados en el estudio ( $k_{max}$ ,  $\text{LOG}_{10}(N_{res})$ ,  $\text{LOG}_{10}(N_0)$  y  $1/b$ ,  $n$ ), así como los indicadores de la bondad del ajuste ( $R^2$ -ajustado,  $A_f$ ). Como se observa, considerando los indicadores de la bondad del ajuste,  $A_f$  y  $R^2$ , para ambos modelos, estos son capaces de describir la supervivencia de *L.monocytogenes* en los medios a distintas concentraciones de NaCl y bajo las condiciones de presión del presente estudio. En cuanto al comportamiento de

los parámetros del modelo de Geeraerd los valores de  $K_{max}$  presentaron una disminución a medida que se incrementó la concentración de NaCl. Esto se puede observar con mayor claridad a partir de los 300 MPa, ya que la tasa de inactivación disminuyó a medida que se incrementó el porcentaje de cloruro sódico presente en el medio.

El parámetro  $1/b$  (tabla 1) obtenido a partir del inverso de  $b$  del modelo de Weibull aumentó a medida que se incrementa la concentración de NaCl dentro de cada nivel de presión, lo que corrobora lo indicado con anterioridad, que a concentraciones elevadas de NaCl existe una cierta protección del microorganismo a las HHP. En cuanto al efecto de la presión sobre el valor de  $1/b$  se puede visualizar que a medida que el tratamiento fue más intenso los valores disminuyeron, indicando una disminución en la resistencia del microorganismo. En todos los casos los valores de  $n$  fueron inferiores a 1 debido a la presencia de colas.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos para la inactivación de *L. monocytogenes* a diversas presiones y concentraciones de NaCl.

Presión (MPa)	NaCl (% p/v)	Modelo Geeraerd					Modelo Weibull				
		$k_{max} (min^{-1})$	$LOG10(N_{res})$	$LOG10(N_0)$	$Af$	$R^2$	$1/b$	$n$	$Af$	$R^2$	
200	0	0,33 (0,02)*	-1,05 (0,03)	0,03 (0,02)	1,02	0,97	4,50	0,55 (0,06)	1,03	0,91	
	0,1	0,33 (0,03)	-1,07 (0,04)	0,03 (0,04)	1,02	0,96	4,78	0,57 (0,07)	1,03	0,90	
	0,5	0,26 (0,06)	-0,25 (0,01)	0,00 (0,02)	1,02	0,84	4,43	0,04 (0,03)	1,02	0,85	
	0,8	0,36 (0,03)	-0,27 (0,01)	0,00 (0,02)	1,04	0,86	4,74	0,11 (0,04)	1,02	0,86	

<b>300</b>	0	0,58 (0,06)	-1,02 (0,03)	0,05 (0,04)	1,03	0,95	2,80	0,40 (0,05)	1,04	0,89
	0,1	0,42 (0,04)	-0,98 (0,03)	-0,03 (0,03)	1,01	0,96	2,80	0,40 (0,05)	1,02	0,89
	0,5	0,23 (0,04)	-0,60 (0,03)	-0,09 (0,03)	1,02	0,88	4,52	0,34 (0,03)	1,01	0,95
	0,8	0,38 (0,06)	-0,58 (0,02)	-0,05 (0,03)	1,02	0,90	3,86	0,30 (0,04)	1,01	0,92
<b>350</b>	0	2,28 (0,09)	-7,13 (0,12)	0,35 (0,15)	1,01	0,99	0,51	0,48 (0,07)	1,04	0,85
	0,1	2,29 (0,11)	-7,13 (0,14)	0,48 (0,18)	1,01	0,98	0,54	0,50 (0,08)	1,05	0,84
	0,5	1,76 (0,06)	-7,14 (0,10)	0,21 (0,11)	1,01	0,99	0,68	0,57 (0,07)	1,04	0,90
	0,8	1,32 (0,06)	-6,68 (0,15)	0,37 (0,14)	1,02	0,98	1,35	0,78 (0,06)	1,05	0,95
<b>400</b>	0	5,13 (0,23)	-7,51 (0,11)	-0,58 (0,14)	1,01	0,98	0,27	0,44 (0,04)	1,01	0,95
	0,1	5,63 (0,58)	-7,07 (0,19)	0,78 (0,28)	1,01	0,94	0,25	0,38 (0,02)	1,01	0,98
	0,5	2,60 (0,31)	-6,41 (0,33)	-1,36 (0,28)	1,02	0,88	0,31	0,37 (0,02)	1,01	0,97
	0,8	1,78 (0,23)	-5,77 (0,45)	-1,36 (0,25)	1,02	0,83	0,37	0,37 (0,02)	1,01	0,97
<b>450</b>	0	28,76 (3,04)	-6,72 (0,16)	0,00 (0,39)	1,01	0,92	0,16	0,09 (0,02)	1,01	0,96
	0,1	25,26 (0,83)	-6,07 (0,05)	0,00 (0,01)	1,00	0,99	0,18	0,06 (0,00)	1,00	0,99
	0,5	24,30 (2,20)	-5,86 (0,12)	0,00 (0,01)	1,01	0,94	0,19	0,11 (0,01)	1,00	0,99
	0,8	19,60 (1,88)	-5,02 (0,11)	0,00 (0,00)	1,01	0,93	0,23	0,11 (0,02)	1,01	0,97

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

El ajuste de los datos obtenidos para *Ps. fluorescens* se pueden observar en la tabla 2. De igual manera que a lo descrito anteriormente para *L. monocytogenes*, los valores de *kmax* (modelo de Geeraerd) disminuyeron con el aumento de la concentración de NaCl para los mismos valores de presión. El comportamiento del parámetro *1/b* de Weibull presentó características diferentes dependientes de la presión de tratamiento, ya que a presiones relativamente bajas (200-300 MPa) los valores entre las presiones disminuyeron. Por tanto, un incremento del contenido de NaCl favoreció la reducción microbiana, no obstante a partir del tratamiento de 350 MPa los valores de *1/b* se incrementaron de forma paulatina al incrementar el contenido de cloruro sódico.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos para la inactivación de *Ps. fluorescens* a diversas presiones y concentraciones de NaCl.

Presión (MPa)	NaCl (% w/v)	Modelo Geeraerd				Modelo Weibull				
		<i>kmax</i> (min <sup>-1</sup> )	LOG10( <i>N<sub>res</sub></i> )	LOG10( <i>N<sub>0</sub></i> )	<i>Af</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	1/ <i>b</i>	<i>n</i>	<i>Af</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
200	0	0,39 (0,03)*	-0,59 (0,01)	-0,02 (0,01)	1,01	0,98	4,27	0,34 (0,03)	1,02	0,95
	0,1	0,35 (0,11)	-0,52 (0,02)	0,02 (0,01)	1,00	0,92	3,64	0,26 (0,05)	1,03	0,85
	0,5	0,26 (0,06)	-0,58 (0,04)	-0,09 (0,04)	1,01	0,83	4,15	0,30 (0,04)	1,02	0,90
	0,8	0,38 (0,05)	-0,58 (0,02)	-0,05 (0,03)	1,01	0,93	3,85	0,30 (0,03)	1,01	0,95
300	0	0,30 (0,03)	-12,77 (0,15)	-0,21 (0,07)	1,02	0,95	4,07	0,80 (0,06)	1,03	0,95
	0,1	0,27 (0,03)	-12,74 (0,45)	-0,25 (0,08)	1,03	0,92	3,33	0,69 (0,07)	1,03	0,91
	0,5	0,25 (0,03)	-13,49 (0,20)	-0,29 (0,08)	1,02	0,90	6,39	0,93 (0,07)	1,05	0,89
	0,8	0,23 (0,05)	-13,49 (0,25)	-0,29 (0,08)	1,02	0,90	3,46	0,70 (0,07)	1,03	0,89
350	0	1,09 (0,07)	-3,86 (0,09)	-0,21 (0,11)	1,01	0,97	0,78	0,41 (0,04)	1,02	0,93
	0,1	0,97 (0,07)	-3,91 (0,10)	-0,27 (0,11)	1,01	0,97	0,87	0,45 (0,03)	1,02	0,97
	0,5	1,02 (0,05)	-3,23 (0,06)	-0,11 (0,07)	1,01	0,98	0,94	0,42 (0,04)	1,02	0,94
	0,8	0,79 (0,10)	-2,52 (0,09)	-0,29 (0,12)	1,01	0,91	0,96	0,33 (0,03)	1,01	0,95
400	0	3,46 (0,53)	-6,46 (0,29)	-1,45 (0,34)	1,02	0,85	0,26	0,30 (0,02)	1,01	0,98
	0,1	2,54 (0,43)	-6,78 (0,45)	-1,89 (0,38)	1,02	0,78	0,25	0,28 (0,02)	1,01	0,97
	0,5	2,75 (0,33)	-6,10 (0,28)	-1,25 (0,26)	1,02	0,89	0,32	0,37 (0,01)	1,01	0,99
	0,8	2,05 (0,24)	-5,06 (0,28)	-0,97 (0,21)	1,02	0,88	0,43	0,42 (0,02)	1,01	0,99
450	0	33,49 (2,03)	-6,52 (0,03)	0,00 (0,00)	1,00	0,99	0,16	0,01 (0,00)	1,04	0,99
	0,1	29,43 (1,59)	-6,49 (0,07)	0,00 (0,01)	1,00	0,98	0,16	0,05 (0,01)	1,01	0,99
	0,5	31,73 (2,91)	-6,46 (0,07)	0,00 (0,00)	1,00	0,98	0,16	0,03 (0,01)	1,01	0,99
	0,8	26,60 (2,00)	-4,98 (0,02)	0,00 (0,02)	1,00	0,99	0,20	0,00 (0,00)	1,01	0,99

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

De acuerdo a los datos cinéticos de la tabla 3, *S. aureus* presentó la mayor resistencia a los tratamientos por HHP siendo necesario incrementar la presión hasta 550 MPa para obtener un nivel de inactivación apreciable. Los valores de *Kmax* disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de NaCl en el

medio de referencia, indicando por tanto una ligera protección del microorganismo. No obstante, para presiones inferiores a 500 MPa los valores de  $K_{max}$  no se vieron afectados directamente por la presencia de cloruro sódico. Al analizar el comportamiento del parámetro  $1/b$  del modelo de Weibull se observa una disminución del valor dentro de cada nivel de presión al aumentar el porcentaje de NaCl. Del mismo modo, un incremento en la presión desde 200 hasta 550 MPa supuso una disminución de los valores de  $1/b$ . El parámetro de forma,  $n$ , resultó en todos los casos  $<1$  debido a la presencia de colas.

La presencia de colas para los tres microorganismos parece indicar que, para un mismo nivel de presión, incrementos considerables en el tiempo de tratamiento no se traducen en incrementos significativos en el nivel de inactivación, evidenciando la existencia de subpoblaciones supervivientes y más resistentes a los tratamientos, de acuerdo a estudios previos llevados a cabo por Peleg, (2000) y Buzrul et al. (2005). No obstante, como se ha indicado en capítulos anteriores, estos comportamientos pueden verse modificados dependiendo de la concentración inicial ( $N_0$ ).

Como se ha podido comprobar mediante los valores del parámetro de exactitud  $A_f$  y  $R^2$  ajustado, para los datos experimentales obtenidos en los diferentes microorganismos, estos valores indican que los modelos estudiados presentan un buen ajuste de los datos experimentales, ya que los valores de  $A_f$  oscilan entre 1 y 1,06 y los de  $R^2$  ajustado se encuentran en la mayoría de los casos cercanos a 1. Tanto el modelo de Weibull como el de Geeraerd parecen ser capaces de interpretar correctamente el comportamiento de las curvas de supervivencia. Esto se puede observar al analizar los valores  $A_f$  y  $R^2$ .

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos para la inactivación de *S. aureus* a diversas presiones y concentraciones de NaCl.

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

Presión (MPa)	NaCl (% p/v)	Modelo Geeraerd				Modelo Weibull				
		<i>kmax</i> (min <sup>-1</sup> )	LOG10( <i>N<sub>res</sub></i> )	LOG10( <i>N0</i> )	<i>Af</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	1/ <i>b</i>	<i>n</i>	<i>Af</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
200	0	0,38 (0,19)*	-0,11 (0,01)	0,00 (0,02)	1,01	0,80	6,75	0,00 (0,07)	1,04	0,75
	0,1	0,24 (0,04)	-0,25 (0,01)	0,01 (0,01)	1,02	0,97	7,83	0,01 (0,02)	1,11	0,53
	0,5	0,42 (0,07)	-0,32 (0,01)	0,00 (0,02)	1,01	0,97	7,55	0,20 (0,14)	1,05	0,80
	0,8	0,28 (0,05)	-0,23 (0,01)	0,00 (0,01)	1,01	0,96	7,66	0,48 (0,13)	1,09	0,72
300	0	0,29 (0,04)	-0,57 (0,02)	-0,02 (0,02)	1,02	0,93	5,65	0,42 (0,04)	1,03	0,93
	0,1	0,23 (0,04)	-0,44 (0,03)	-0,01 (0,02)	1,03	0,90	8,40	0,46 (0,05)	1,03	0,90
	0,5	0,38(0,05)	-0,25 (0,01)	0,00 (0,02)	1,05	0,94	3,90	0,08 (0,02)	1,02	0,83
	0,8	0,33 (0,03)	-0,29 (0,01)	0,00 (0,02)	1,04	0,95	4,57	0,10 (0,03)	1,02	0,87
350	0	0,24 (0,04)	-0,80 (0,07)	0,04 (0,01)	1,04	0,87	7,69	0,62 (0,10)	1,04	0,81
	0,1	0,25 (0,03)	-0,85 (0,05)	0,06 (0,04)	1,03	0,94	8,08	0,67 (0,09)	1,04	0,88
	0,5	0,31 (0,06)	-0,82 (0,04)	0,02 (0,01)	1,06	0,88	8,47	0,76 (0,09)	1,03	0,89
	0,8	0,36 (0,08)	-0,24 (0,01)	0,01 (0,01)	1,02	0,83	8,98	0,29 (0,06)	1,02	0,81
400	0	0,41 (0,05)	-0,70 (0,06)	0,01 (0,02)	1,02	0,96	6,62	0,74 (0,06)	1,02	0,95
	0,1	0,46 (0,07)	-0,71 (0,07)	0,01 (0,03)	1,03	0,94	5,33	0,81 (0,09)	1,05	0,91
	0,5	0,48 (0,06)	-0,64 (0,04)	-0,01 (0,02)	1,02	0,95	7,07	0,62 (0,05)	1,02	0,94
	0,8	0,33 (0,04)	-0,83 (0,09)	0,00 (0,02)	1,02	0,97	7,77	0,83 (0,05)	1,02	0,97
450	0	0,62 (0,05)	-1,36 (0,08)	-0,07 (0,03)	1,01	0,96	2,71	0,65 (0,04)	1,01	0,96
	0,1	0,45 (0,06)	-1,03 (0,11)	-0,03 (0,02)	1,02	0,94	4,07	0,71 (0,06)	1,02	0,94
	0,5	0,54 (0,06)	-0,75 (0,04)	-0,02 (0,02)	1,02	0,96	4,18	0,60 (0,05)	1,02	0,94
	0,8	0,68 (0,06)	-0,72 (0,03)	0,01 (0,02)	1,02	0,97	4,26	0,59 (0,06)	1,03	0,94
500	0	1,88 (0,19)	-1,81 (0,08)	-0,09 (0,02)	1,03	0,84	0,90	0,35 (0,03)	1,01	0,95
	0,1	0,66 (0,09)	-1,87 (0,05)	-0,07 (0,02)	1,03	0,89	1,50	0,59 (0,05)	1,02	0,93
	0,5	0,93 (0,07)	-1,73 (0,07)	-0,01 (0,01)	1,02	0,96	2,08	0,69 (0,05)	1,02	0,95
	0,8	0,96 (0,08)	-1,78 (0,09)	0,03 (0,06)	1,06	0,95	2,16	0,55 (0,06)	1,08	0,94
550	0	13,00 (0,88)	-3,22 (0,05)	0,00 (0,01)	1,01	0,97	0,34	0,08 (0,01)	1,01	0,98
	0,1	10,00 (0,52)	-3,18 (0,03)	0,00 (0,00)	1,00	0,98	0,37	0,11 (0,02)	1,00	0,95
	0,5	6,66 (0,56)	-3,09 (0,09)	0,08 (0,02)	1,01	0,91	0,47	0,26 (0,02)	1,01	0,97
	0,8	7,06 (0,52)	-2,82 (0,04)	0,00 (0,02)	1,00	0,97	0,46	0,19 (0,03)	1,00	0,97

Después de analizar de forma individual cada uno de los microorganismos, en lo que respecta al comportamiento de  $k_{max}$  y de  $1/b$  se observa que a la presión de 450 MPa para *Ps. fluorescens* y *L. monocytogenes* los valores  $k_{max}$  estuvieron entre aproximadamente 30,3 y 24,4  $\text{min}^{-1}$  respectivamente, mientras que para *S. aureus* fueron mucho menores (aproximadamente 0,60  $\text{min}^{-1}$ ), lo que hace que este microorganismo posea la mayor resistencia a las HHP de los organismos estudiados en el presente trabajo. De forma similar, al analizar el parámetro  $1/b$  se observó el mismo comportamiento descrito anteriormente, obteniendo valores para *Ps. fluorescens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* de aproximadamente 0,17; 0,19 y 3,81, respectivamente, siendo nuevamente *S.aureus* el que presenta una mayor resistencia al tratamiento de HHP independientemente de las concentraciones de NaCl estudiadas.

En la tabla 4 se pueden observar los valores para el parámetro  $z$  de presión ( $z_p$ ), obtenido a partir del valor de los parámetros cinéticos del modelo de Weibull. El  $z_p$  representa la inversa negativa de la pendiente de la recta, que enfrenta el  $\log_{10}$  de  $1/b$  frente a la Presión. Este valor se obtuvo con la finalidad de observar la resistencia de cada microorganismo bajo las diversas concentraciones de NaCl. En cuanto al comportamiento microbiano frente a la concentración de NaCl, se demuestra que incrementos en el porcentaje de cloruro sódico influyen en la intensidad del tratamiento. En el caso de *L. monocytogenes* y *Ps.fluorescens* es necesario incrementar el nivel de presión desde 158,73 a 172,41 MPa y desde 156,25 a 181,82 MPa para las concentraciones de 0 y 0,8%, respectivamente. Los valores de  $z_p$  obtenidos para *S. aureus* fueron superiores en todas las concentraciones en comparación con los microorganismos mencionados anteriormente, ya que para las mismas concentraciones de 0 y



0,8% fueron necesarios incrementos en los niveles de presión de 277,78; 344,83 respectivamente, siendo el microorganismo en el que es más visible el incremento en la baroprotección.

**Tabla 4.** Valores de  $Z_p$  para *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens* y *S. aureus* para los diversos porcentajes de NaCl.

<b>Valores <math>Z_p</math></b>			
<b>NaCl (%p/v)</b>	<b><i>L. monocytogenes</i></b>	<b><i>Ps. fluorescens</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
0	158,73	156,25	277,78
0,1	153,85	166,67	285,71
0,5	161,29	156,25	357,14
0,8	172,41	181,82	344,83

## CONCLUSIONES

Se observaron variaciones significativas ( $P < 0.05$ ) en la resistencia de los tres microorganismos estudiados, *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* a los diversos tratamientos de HHP debido al incremento de las concentraciones de NaCl en el medio de referencia. Los microorganismos resuspendidos en medios con elevados porcentajes de NaCl fueron más resistentes a los tratamientos por HHP, lo que indicó una cierta protección del cloruro sódico a los organismos tratados por altas presiones, estos resultados pueden ser de gran ayuda para la industria alimentaria al momento de diseñar los nuevos tratamientos por HHP.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, los dos modelos, tanto Weibull como Geeraerd, pueden interpretar correctamente los datos experimentales de

inactivación para *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* bajo las diversas concentraciones de NaCl. Sin embargo, el modelo de Weibull es más simple y más fácil de incorporar en una hipotética evaluación de la exposición.

Según estudios previos publicados por Koseki & Yamamoto (2007) el efecto baroprotector del cloruro sódico se produce a concentraciones superiores al 15%, llegando incluso a neutralizar por completo el efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se observó un efecto baroprotector a menores concentraciones de cloruro sódico 0,5 y 0,8% NaCl.

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer al Instituto Alpina de Investigación (IAI) y al proyecto AGL 2013-48993-C2-2-R por proporcionar los fondos necesarios para realizar el presente trabajo y al IATA (CSIC) por sus instalaciones.

## **REFERENCIAS**

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., & Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4248-4251.

Arqués, J. L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., & Nunez, M. (2005). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 98(2), 254-260.

Aymerich, T., Jofre, A., Garriga, M., & Hugas, M. (2005). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 68(1), 173–177.

Breslin, P. A. S., & Beauchamp, G. K. (1995). Suppression of bitterness by sodium: variation among bitter taste stimuli. *Chemical senses*, 20(6), 609-623.

Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F. (2005). Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Research International* 38: 151–157.

CDC Centers for Disease Control and Prevention Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010; 59:418–22

Cebrián G, Michiels CW, Mañas P, Condón S (2010) Biological approach to modeling of *Staphylococcus aureus* high-hydrostatic-pressure inactivation kinetics. *Appl Environ Microbiol* 76:6982-6990

Donsì, F., Annunziata, M., & Ferrari, G. (2013). Microbial inactivation by high pressure homogenization: Effect of the disruption valve geometry. *Journal of Food Engineering*, 115(3), 362-370.

Gao, Y. L., Ju, X. R., & Jiang, H. H. (2006). Statistical analysis of inactivation of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure and heat in milk buffer. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(6), 670-678.

Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 451-457.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. and Van Impe., J.F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209

Gillette, M. (1985). Flavor effects of sodium chloride. *Food technology (USA)*.

Goh, E. L.C., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Buckle, K. A., Fleet, G. H. (2007). Baroprotective effect of increased solute concentrations on yeast and moulds during high pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 535–542

HHS and USDA. (2010a). Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2010, to the Secretary of Agriculture and the Secretary of Health and Human Services. Washington, DC: USDA/ARS. <http://www.cnpp.usda.gov/Publications/DietaryGuidelines/2010/DGAC/Report/2010DGACReport-camera-ready-Jan11-11.pdf> (accessed July 21, 2014).

HHS and USDA (U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture). (2010b). Dietary Guidelines for Americans, 2010. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2010/DietaryGuidelines2010.pdf> (accessed July 20, 2014).

Koseki, S., Yamamoto, K. (2007). Water activity of bacterial suspension media unable to account for the baroprotective effect of solute concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 115, 43–47.

Liem, D. G., Miremadi, F., & Keast, R. S. (2011). Reducing sodium in foods: the effect on flavor. *Nutrients*, 3(6), 694-711.

López-Pedemonte, T., Roig-Sagués, A. X., De Lamo, S., Gervilla, R., & Guamis, B. (2007). High hydrostatic pressure treatment applied to model cheeses made from cow's milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 18(5), 441-447.

Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2004). Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2013-2020.

Myers, K., Montoya, D., Cannon, J., Dickson, J., & Sebranek, J. (2013). The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. *Meat science*, 93(2), 263-268.

O'Flynn, C. C., Cruz-Romero, M. C., Troy, D. J., Mullen, A. M., & Kerry, J. P. (2014). The application of high-pressure treatment in the reduction of phosphate levels in breakfast sausages. *Meat science*, 96(1), 633-639.

O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Kelly, A. L., Beresford, T. P., & Murphy, P. M. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4890–4896.

Oxen, P., Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentration against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 26, 220–223.

Peleg, M. & Cole, M.B., 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci.* 38, 353–380.

Peleg, M. (2000). Microbial survival curves-the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International* 33: 531–538.

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1081-1093.

Pina-Pérez, M. C., Silva-Angulo, A. B., Rodrigo, D., & López, A. M. (2012). A preliminary exposure assessment model for *Bacillus cereus* cells in a milk based beverage: Evaluating High Pressure Processing and antimicrobial interventions. *Food control*, 26(2), 610-613.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(5), 501-508.

Seman, D. L., Borger, A. C., Meyer, J. D., Hall, P. A., & Milkowski, A. L. (2002). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. *Journal of Food Protection*, 65(4), 651–658.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2011 [July 28, 2014]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

Syed, Q. A., Buffa, M., Guamis, B., & Saldo, J. (2014). Effect of compression and decompression rates of high hydrostatic pressure on inactivation of *Staphylococcus aureus* in different matrices. *Food and bioprocess technology*, 7(4), 1202-1207.

Takahashi, K., Ishii, H., Ishikawa H. Sterilisation of bacteria and yeasts by hydrostatic pressure at low temperature: Effect of temperature, pH and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids R. Hayashi (Ed.), *High pressure bioscience and food science*, San Ei Pub, Kyoto (1993), pp. 244–249

Torres, E. F., González-M, G., Klotz, B., & Rodrigo, D. (2015). Effects of high hydrostatic pressure and temperature increase on *Escherichia coli* spp. and pectin methyl esterase inactivation in orange juice. *Food Science and Technology International*, 1082013215582107.

Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C., & Michiels, C. W. (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International journal of food microbiology*, 88(1), 1-9.

WHO (World Health Organization). Reducing salt intake in populations: report of a WHO forum and technical meeting 5–7 October, 2006 WHO, Paris, France (2007) 1–65.

Wuytack, E. Y., Diels, A. M., & Michiels, C. W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3), 205-212.

# CAPÍTULO III

## **Influencia del tratamiento de Altas Presiones sobre bacterias patógenas y alteradoras y las características fisicoquímicas del queso fresco.**

Torres, E.F<sup>a.</sup>, González-M, G<sup>b.</sup>, Klotz, B<sup>b</sup> & Martínez, A<sup>a.</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos  
Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico  
46980 Paterna (Valencia)  
Spain.

<sup>b</sup> Alpina Research Institute (IAI), Alpina Productos Alimenticios S.A  
Edificio Corporativo Km 3 vía  
251001 Briceño-Sopó (Cundinamarca)

Torres, E.F., González-M, G., Klotz, B, Martínez, A. 2016. Influencia de las HHP sobre la carga microbiana y las características físicas químicas del queso fresco. Enviado a: Journal of Food Safety and Food Quality

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de una matriz alimentaria compleja (queso fresco) con una concentración del 0,5% de NaCl en la inactivación de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 y *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, utilizando diversas presiones desde 250 hasta 550 MPa con tiempos comprendidos entre 0 y 20 minutos. Los resultados obtenidos para los medios queso fresco y el control (agua peptona 0,5% NaCl) se ajustaron al modelo de distribución de Weibull. Por otro parte, se evaluó el efecto de estos procesos en las propiedades fisicoquímicas del queso fresco analizando parámetros de textura, color, actividad de agua ( $a_w$ ) y pH. Tanto *L. monocytogenes* como *Ps. fluorescens* inoculados en queso fresco presentaron una menor resistencia a los tratamientos por HHP que cuando se trataron en agua de peptona con 0,5% NaCl. Sin embargo, en el caso de *S. aureus* el queso fresco pareció proporcionar una barrera protectora frente a las HHP. Esta resistencia varió de acuerdo a las condiciones de tratamiento (tiempo-presión). El modelo de Weibull es capaz de ajustar correctamente las curvas de supervivencia tras el tratamiento por HHP tanto para los microorganismos tratados en queso fresco como en el control de agua de peptona con 0,5% NaCl. La variación de presión y tiempo de tratamiento modificó significativamente las características de pH, color, textura en el queso fresco. Sin embargo, los valores de  $a_w$  no se vieron afectados por la presurización. Este estudio muestra el potencial de las Altas Presiones Hidrostáticas como alternativa para controlar las bacterias patógenas y alteradoras en queso fresco y como proceso no convencional para generar nuevas texturas de gran interés industrial.



## INTRODUCCIÓN

Los tratamientos de HHP han venido tomando fuerza en los últimos años debido a que la tecnología ha demostrado ser efectiva para la inactivación de microorganismos patógenos y alteradores así como para la inactivación de enzimas que afectan negativamente a la vida útil de los productos alimenticios (Smiddy et al. 2005; Alpas et al. 1999; Torres et al. 2015). En la actualidad los consumidores son más conocedores de los problemas de seguridad alimentaria de los alimentos y en consecuencia solicitan a los mercados productos que sean lo más saludables posibles, libres de conservantes y que mantengan las propiedades sensoriales originales (Evert-Arriagada et al. 2014). Los tratamientos de conservación tradicionales aunque producen la inactivación de los microorganismos patógenos y alteradores, pueden llegar a alterar en gran medida las características sensoriales y los valores nutricionales (vitaminas, aminoácidos) de los alimentos.

Diversos estudios han sugerido la utilización de tecnologías no térmicas para el procesado de leche y derivados, sin embargo no se cuenta con suficiente información con respecto al efecto de la matriz alimentaria y la concentración de NaCl sobre la inactivación microbiana de patógenos y alteradores.

El mercado mundial de derivados lácteos ha venido presentando un incremento importante en cuanto a consumo y producción tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea (EU). En el año 2014 según los datos aportados por “United States Department of Agriculture” (USDA) la producción conjunta de queso fue de 14.750 (1000 Toneladas Métricas) en comparación con la producción de 2011 que rondó las 13.787 (1000 Toneladas Métricas). El queso fresco es un derivado

lácteo que se caracteriza por presentar valores de pH cercanos a la neutralidad junto con valores elevados tanto de humedad como de actividad de agua (0,97). Estas características propias hacen que este producto pueda soportar el crecimiento de microorganismos tanto patógenos como alteradores que lo pueden contaminar a lo largo del proceso de producción (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* sp, mohos, levaduras) modificando por tanto la vida útil del producto. En el caso concreto de *Ps. fluorescens* se producen modificaciones severas en el color (pigmentos azulados), sabor, aroma (Evert-Arriagada et al. 2012; Moody et al. 2014; Martin et al. 2011).

Según los datos publicados por el “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) en 2011 se presentaron una media anual de 1.455 de hospitalizaciones en EEUU, de las cuales se produce una media de 255 muertes por *L.monocytogenes*. Estos brotes se relacionaron con el consumo de alimentos mínimamente procesados (queso, distintos productos vegetales y productos cárnicos). Scallan et al. (2011) indicó que *S. aureus* causa aproximadamente 241.148 enfermedades, 1.064 hospitalizaciones y 6 muertes por año. Estos datos se basan en estudios realizados en Estados Unidos en 2006. Según la información obtenida de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), durante los años 2009-2013 se han registrado un total de 290 brotes causados por toxinas estafilocócicas, lo que supone un 7% del total de brotes relacionados con los alimentos, por lo que la importancia de los derivados lácteos por su contribución a los casos de intoxicación alimentaria es importante. Este microorganismo se caracteriza por contaminar diversos alimentos de consumo diario, aunque según estudios realizados por “Food and Drug Administration”

(FDA, 2012) existen alimentos que se relacionan frecuentemente con toxiinfecciones alimentarias (leche, queso, producto de pastelería, huevo, cárnicos). Esta bacteria se caracteriza por ser uno de los patógenos no esporulados más resistentes a los tratamientos convencionales de conservación debido principalmente a su morfología.

Según indican diferentes autores (Van Opstal et al. 2003; O'Flynn et al. 2014; Bak et al. 2012; Goh et al. 2007; Smiddy et al. 2005) existen factores intrínsecos de los alimentos (cloruro sódico (NaCl), azúcares, grasas, pH) que pueden afectar a la efectividad de los tratamientos disminuyendo la inactivación enzimática y microbiana. Por tal motivo es importante llevar a cabo estudios con esta tecnología para determinar el efecto de la matriz alimento tanto sobre los microorganismos como sobre los enzimas.

El objetivo del presente estudio fue establecer y determinar la diferencia en baroresistencias de los microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565) y alteradores (*Pseudomonas fluorescens* ATCC13525) en queso fresco comparándolo con lo que ocurre en medio de referencia agua de peptona con la misma concentración de sal (NaCl) que la del queso fresco. Al mismo tiempo, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas (aw, textura, pH, color) del queso fresco tratado por HHP.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Medio de referencia.**

Se utilizó agua de peptona al 0,1% (Scharlab Chemie S. A. Barcelona, España). Los estudios se realizaron con concentraciones de cloruro de sodio del 0,5%. El pH del medio fue de 6,5 medido mediante un pH-metro modelo GLP-21 (Crison, España).

### **Queso fresco**

El queso fresco procedía de leche pasteurizada mezcla de vaca y oveja. Este se compró directamente del comercio local de Valencia, teniendo en cuenta que la concentración de NaCl no fuera superior al 0,5%. Las muestras de queso fresco se almacenaron a una temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$  para su posterior inoculación y tratamiento por HHP.

### **Cultivos microbianos**

Los microorganismos puros liofilizados congelados proporcionados por la Colección Española de Cultivos Tipo *L. monocytogenes* ATCC 19114, *S. aureus* ATCC 13565 y *Ps. fluorescens* ATCC13525 se rehidrataron en 15 mL de "Tryptic Soy Broth" (TBS, Scharlab Chemie Barcelona, Spain). Después de 20 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para *L. monocytogenes* y *S. aureus* y 22 h a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  para *Ps. fluorescens* los cultivos se transfirieron a un frasco con 500 mL de "Tryptic Soy Broth" (TSB) y se incubaron por 12h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para *L. monocytogenes* y *S. aureus* y por 22h a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  para *Ps. fluorescens* en agitación a 70 r.p.m hasta conseguir células en fase estacionaria. El volumen de 500 mL se centrifugó dos veces a 5000 r.p.m. durante 15 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante resultante se descartó, el precipitado

generado tras cada una de las centrifugaciones se resuspendió en 100 mL de caldo TSB. Después de la segunda centrifugación el contenido se transfirió a crioviales con capacidad de 2 mL depositando 1 mL de la suspensión celular y 1 mL de caldo TSB con glicerol al 20% e inmediatamente se almacenaron a -80 °C. La concentración final en los crioviales fue de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

### **Tratamiento HHP**

Antes de cada tratamiento de HHP se inoculó cada una de las matrices (agua peptona 0,5% NaCl y queso fresco) con *L. monocytogenes*, *S. aureus* o *Ps. fluorescens* hasta una concentración final aproximada de  $1 \times 10^8$ . Las muestras de queso se inocularon tanto superficialmente como en su interior de forma individual. Para cada tiempo, presión, microorganismo y matriz (agua peptona y queso fresco) se utilizaron tres muestras independientes situadas en bolsas de polietileno metalizadas y termoselladas (MULTIVAC, Thermosealer). Para el análisis de las propiedades fisicoquímicas ( $a_w$ , pH, textura, color) se utilizaron muestras sin inocular. El tratamiento HHP se realizó utilizando una mezcla de agua con etilenglicol como agente presurizante. La temperatura se controló utilizando una camisa de refrigeración conectada a un criostato para mantener la temperatura constante durante el experimento. El tiempo de despresurización fue menor a 1 minuto en todas las experiencias. La temperatura inicial del tratamiento de HHP fue de 20 °C, obteniendo una temperatura final máxima de 38 °C a una presión de 550 MPa. Las presiones utilizadas para el estudio fueron desde 200 a 550 MPa por un tiempo entre 0 y 20 minutos.

## **Análisis microbiológico**

Tras el tratamiento con HHP se homogenizaron las muestras de queso fresco con un stomacher durante 1 minuto (IUL S.A, Barcelona, España). En ambos casos, medio de referencia y homogeneizado procedente del stomacher, se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua de peptona estéril tamponada al 0,1% (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España), y se procedió a su siembra en “Tryptic Soy Agar” TSA (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24h para *L. monocytogenes*, *S. aureus* y durante 48h a 26 °C para *Ps. fluorescens*. Una vez terminada la incubación se llevó a cabo un recuento de células viables en las placas que tenían entre 30-300 colonias. La reducción microbiana por el tratamiento con HHP se expresó como  $\text{Log}_{10} N/N_0$ , donde N correspondía al número de células viables después del tratamiento por HHP y  $N_0$  era el número inicial de microorganismos en el control no tratado.

## **Modelización.**

Los datos de supervivencia se ajustaron al siguiente modelo:

### **Función de Distribución modificada de Weibull.**

$$\log \frac{N}{N_0} = S = -bt^n \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde S es la fracción de supervivientes, t es el tiempo de tratamiento expresado en minutos, b es el parámetro de escala y se puede considerar como el parámetro cinético y n es el parámetro de forma, cuyo valor depende de la forma de la curva de supervivencia. Cuando el valor de  $n < 1$  las curvas de

supervivencia presentan colas, cuando el valor de  $n > 1$ , las curvas de supervivencia presentan hombros. En el caso que el valor de  $n = 1$  la cinética de muerte es log-lineal.

## **Análisis fisicoquímicos**

### **Actividad de agua ( $a_w$ ) queso fresco**

La medida se realizó utilizando un equipo “Benchtop Water Activity Meter” (AquaLab, Modelo 4TE, Pullman, USA) con controlador de temperatura integrado 15 - 50 °C y precisión de  $\pm 0,003 a_w$ . Las mediciones de  $a_w$  en el queso fresco se realizaron por triplicado en muestras no tratadas y tratadas por HHP.

### **pH**

El pH se midió directamente sobre el medio de referencia y sobre el queso fresco por medio de un pH-metro (Crison Basic 20+, Barcelona, España) calibrado a pH 4 y 7. Las mediciones se realizaron por triplicado en muestras no tratadas y tratadas por HHP.

### **Color queso fresco**

El color del queso fresco se determinó mediante un colorímetro Konica Minolta CM-3500d (Konica Minolta Sensing Inc., Japan). Este equipo proporciona los valores de reflectancia, así como las coordenadas del sistema cromático uniforme CIE Lab:  $L^* = 0$  (negro),  $L^* = 100$  (blanco),  $a^*$  = color desde rojo (positivo) a verde (negativo) y  $b^*$  = color desde amarillo (positivo) a azul (negativo), el centro

es acromático. (Bodart et al. 2008). El equipo aporta los resultados calculados automáticamente por el colorímetro ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). La determinación se realizó sobre cubos (2 cm en cada uno de sus lados) de queso fresco tomados a diferentes profundidades del queso. Las mediciones se realizaron por triplicado a muestras de queso fresco no tratado y tratado por HHP. Antes de utilizar el colorímetro, este se estandarizó utilizando una placa de calibración blanca.

La diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) entre las muestras no tratadas y cada una de las muestras de queso tratadas por HHP se calculó siguiendo la ecuación 2 propuesta por Bodart et al. (2008).

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

Donde  $\Delta E^* < 1$  las diferencias de color no son apreciadas por el ojo humano,  $1 < \Delta E^* < 3$  el ojo humano puede apreciar diferencias mínimas de color dependiendo del ángulo,  $\Delta E^* > 3$  las diferencias de color son obvias para el ojo humano (Martínez-Cervera et al. 2011).

### **Textura (TPA)**

Para evaluar la textura de las muestras de queso fresco tratado y no tratado por HHP se utilizó un analizador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra). Las muestras se cortaron en cubos (2 cm en cada uno de sus lados), utilizando un molde metálico. Se realizaron cinco réplicas para cada una de las muestras. La medición se realizó con un disco de compresión



de aluminio de 75mm (P/75), con una velocidad de 1mm/s y tiempo de espera de 5s entre cada uno de los dos ciclos. Las muestras se mantuvieron a temperatura de refrigeración antes de llevarse a cabo el análisis.

### **Análisis de datos**

El ajuste de los modelos se validó usando el factor de exactitud “Accuracy Factor” ( $A_f$ ) (Ecuación 3), el factor bias “Bias Factor ( $B_f$ ) (Ecuación 4) y el  $R^2$  ajustado. Estos parámetros nos dan una idea del ajuste del modelo a la curva de supervivencia del microorganismo, según lo propuesto por Ross (1996) y se definen como:

$$A_f = 10^{\frac{\sum |Log(X_p/X_o)|}{n}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde  $n$  es el número de valores observados, los  $X_p$  son valores ajustados y  $X_o$  son los valores observados. Los valores de  $A_f$  cercanos a 1 nos indican un mejor ajuste del modelo a los valores experimentales.

$$B_f = 10^{\frac{\sum (Log(X_p/X_o))}{n}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde  $n$  es el número de valores observados, los  $X_p$  son valores ajustados y  $X_o$  son los valores observados. Un  $B_f$  con valores iguales a 1 nos indica un modelo de confianza sin tendencias.

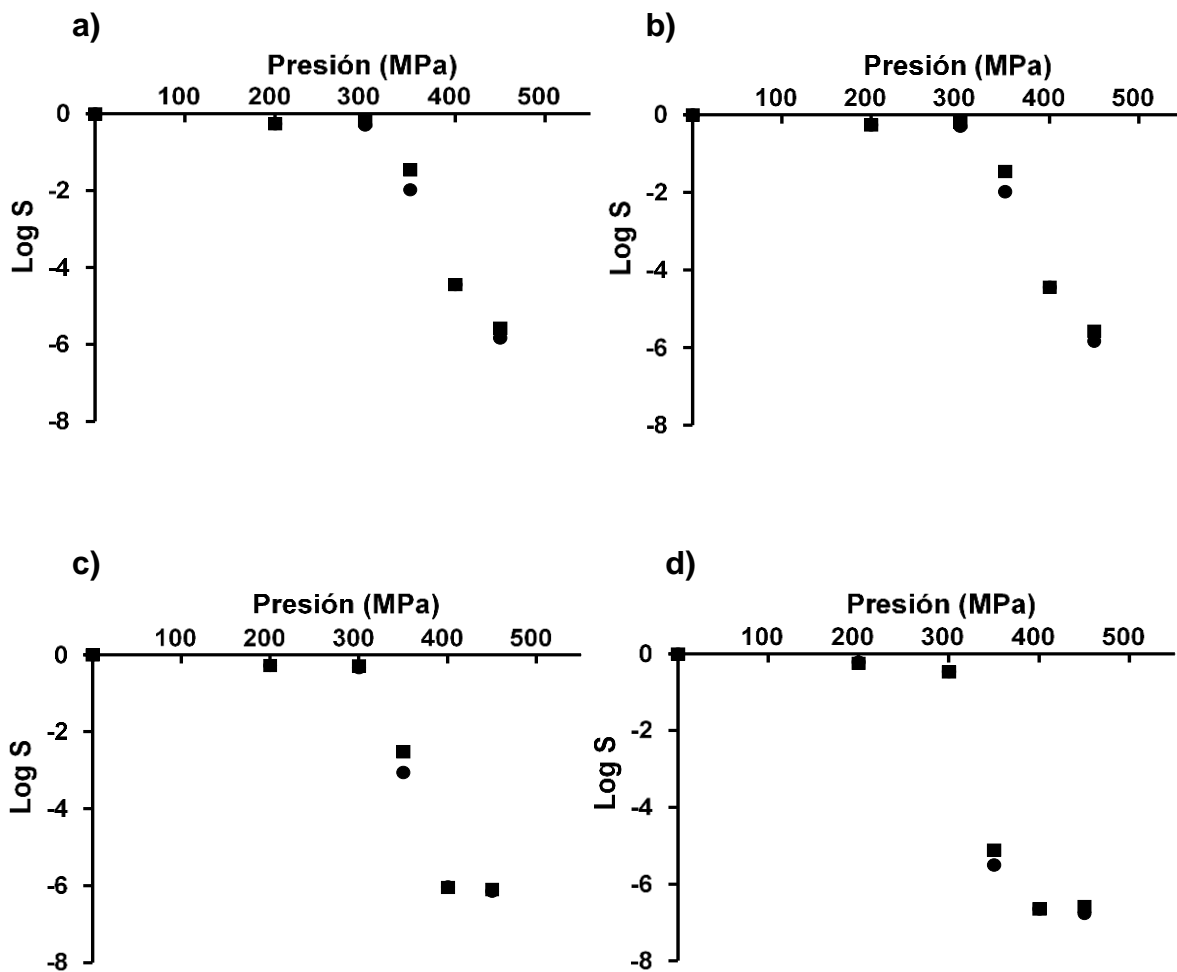
Para evaluar el efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas y la temperatura en la inactivación de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Ps. fluorescens* se realizó un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de

medias con un nivel de confianza del 95%. Todos los datos estadísticos se han analizado mediante los programas informáticos Statgraphics centurion XV, StatPoint.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Inactivación microbiana por HHP**

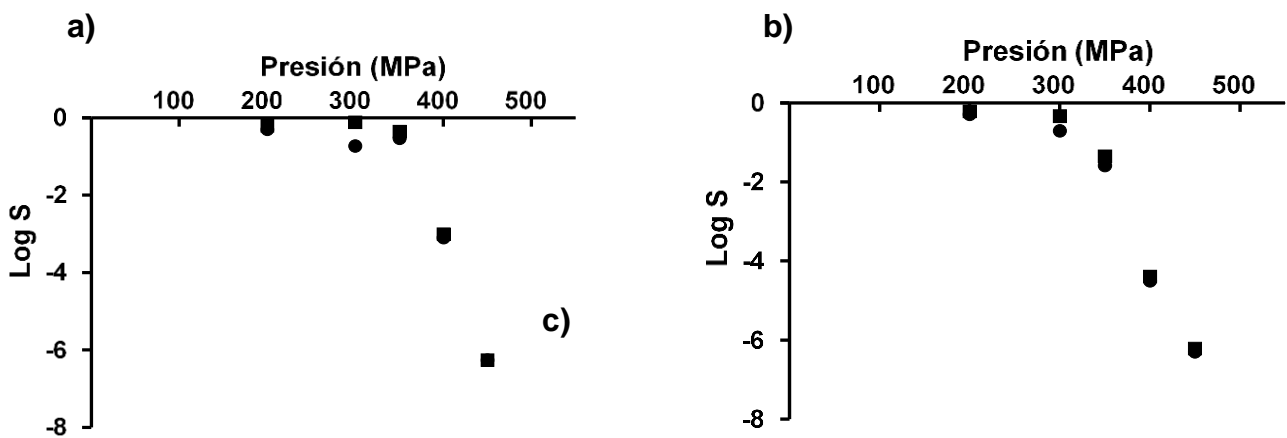
Los resultados de inactivación obtenidos para *L. monocytogenes* a las presiones de trabajo entre 200 y 500 MPa se pueden observar en la figura 1. En todos los casos, al aumentar el tiempo de tratamiento aumentó el nivel de inactivación, por ejemplo a 400 MPa se obtienen 3,27(0,14); 4,43(0,01); 6,03(0,04); 6,64(0,11) y 3,19(0,04); 4,50(0,12); 6,10(0,010); 6,77(0,08) para queso fresco y medio de referencia, respectivamente. En la figura 1 se puede apreciar que para las presiones inferiores a 400 MPa, a todos los tiempos del ensayo (1, 3, 5 y 7 min) se observan diferencias significativas entre las matrices estudiadas (queso fresco y agua peptona 0,5% NaCl), produciéndose una mayor inactivación en *L.monocytogenes* inoculada en la matriz de queso fresco con una concentración de NaCl del 0,5%, independientemente del tiempo de tratamiento. En el caso de los tratamientos a 400 MPa y 450 MPa no hubo diferencias significativas entre las reducciones decimales obtenidas tanto en el queso fresco como en el medio de referencia. El nivel de inactivación de *L. monocytogenes* obtenido en el presente estudio, 6,03(0,04) reducciones logarítmicas, fue superior al descrito por Evrendilek et al. (2008) donde al tratar queso fresco tipo turco elaborado a partir de leche pasteurizada y tratado a 400 MPa durante 5 min obtuvo una reducción de aproximadamente 4,5 ciclos logarítmicos en *L. monocytogenes*.

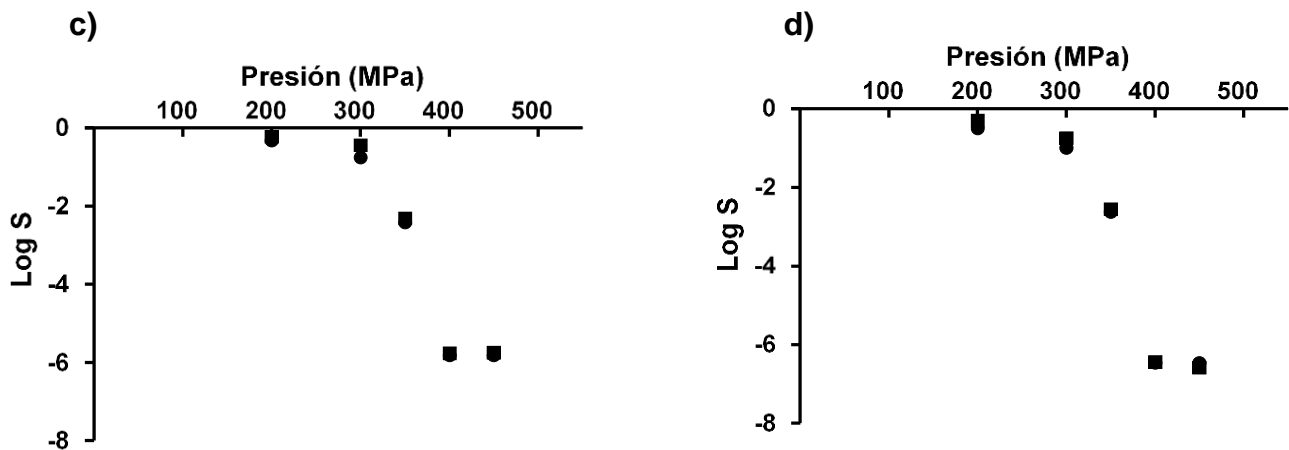


**Figura 1.** Inactivación de *L. monocytogenes* inoculada en queso fresco (●) y agua de peptona al 0,5% de NaCl (■) bajo tiempos comunes de tratamiento (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 7 min.

La figura 2 muestra el comportamiento de *Ps. fluorescens* frente a los diversos tratamientos por HHP. El comportamiento de este microorganismo es similar al observado para *L. monocytogenes*. Como se muestra en la figura 2, al aumentar el tiempo de tratamiento se incrementa el nivel de inactivación, llegándose a alcanzar una reducción superior a 5 ciclos logarítmicos para los tiempos de 5 y 7 min a la presión de 400 y 450 MPa. En relación al efecto de la matriz se observa que para presiones superiores a 300 MPa no hay diferencias significativas

( $p > 0,05$ ) entre los resultados obtenidos para cada una de las matrices estudiadas (queso fresco y agua de peptona con 0,5% de NaCl). Las curvas de supervivencia a las presiones de 400 y 450 MPa formaban colas a los tiempos más largos de tratamiento. Este comportamiento parece indicar que a tiempos de tratamiento largos y presiones altas existe una población de microorganismos residual resistente a la alta presión. Del mismo modo, el comportamiento en la reducción microbiana puede depender directamente de la concentración inoculada. Este comportamiento de *Ps. fluorescens* fue estudiado por Carlez et al. (1993) en carne picada, donde a partir de presiones relativamente bajas (200 MPa) se observaron colas en las curvas de inactivación, llegando a alcanzar una inactivación superior a 5 ciclos logarítmicos con tratamientos a 500 MPa durante 1 min a 20 °C.

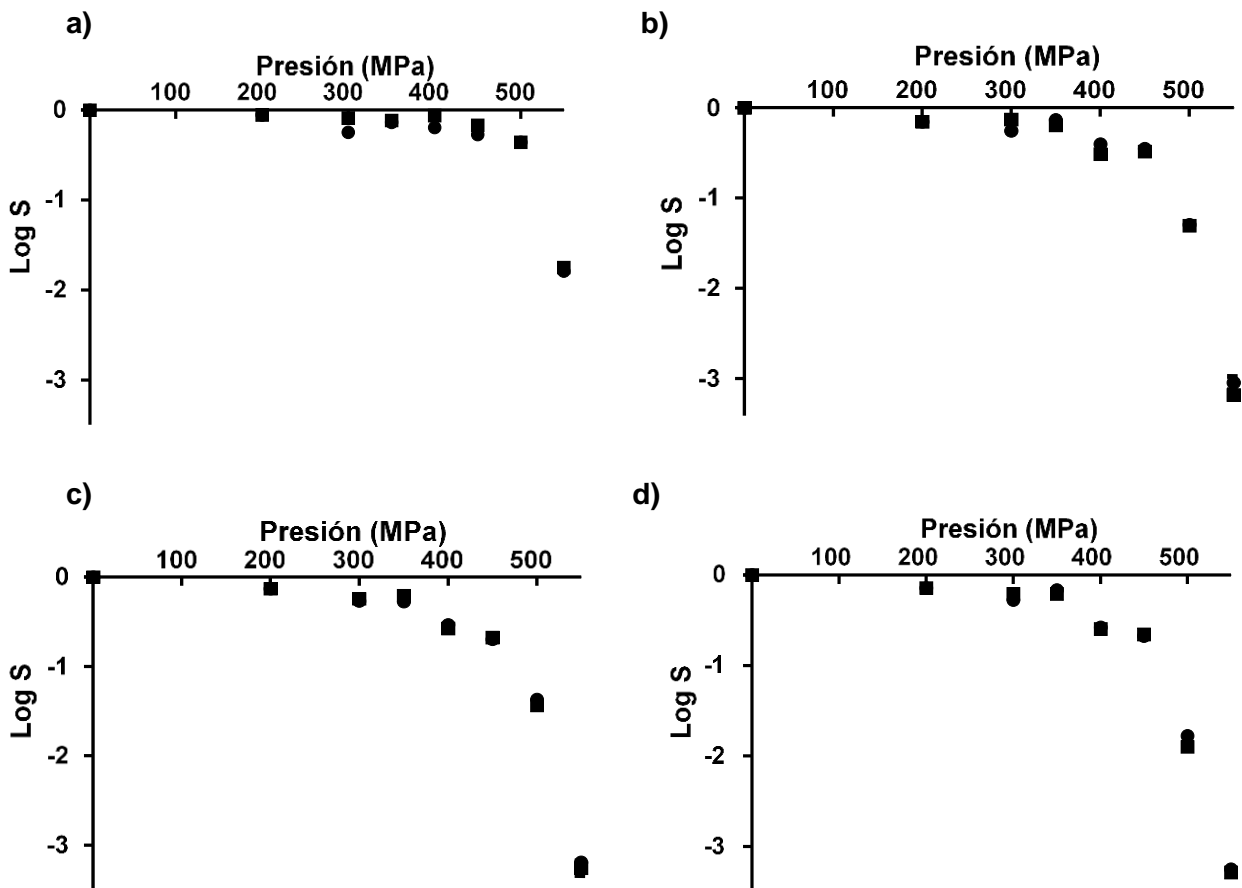




**Figura 2.** Inactivación de *Ps. fluorescens* inoculada en queso fresco (●) y agua de peptona al 0,5% de NaCl (■) bajo tiempos comunes de tratamiento (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 7 min.

El efecto de la alta presión sobre *S. aureus* en ambas matrices se puede apreciar en la figura 3. En todos los casos al aumentar la presión se incrementa el nivel de inactivación de igual forma que al aumentar el tiempo de tratamiento. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Alpas et al. (1999), quienes además observaron una gran variación en los resultados obtenidos para *S. aureus* dependiendo de las cepas utilizadas. En el trabajo de Alpas et al. (1999) se observó que al someter diversas cepas de *S. aureus* a un tratamiento de 345 MPa durante 5 min a 25 °C en medio peptona al 1%, se produjeron disminuciones entre 0,7 a 7,80 ciclos  $\log_{10}$  de la carga inicial inoculada, mientras que los resultados experimentalmente obtenidos en el presente estudio para el tratamiento de 350 MPa durante 5 min produjeron reducciones de 0,3 y 0,2 ciclos  $\log_{10}$  para el medio agua peptona 0,5% NaCl y queso fresco, respectivamente. El resultado se alinea con esa variabilidad en las cepas respecto a la barorresistencia indicada por Alpas et al. (1999). En cuanto al comportamiento de la cepa de *S. aureus* utilizada en nuestro estudio frente a los tratamientos por

HHP, se observa que presiones inferiores a 500 MPa y tiempos relativamente cortos no produjeron reducciones apreciables de la carga inicial inoculada. Al incrementar la presión a 500 y 550 MPa la inactivación aumentó de forma notable aunque no se logran superar las 5 reducciones logarítmicas como en el caso de *L. monocytogenes* y *Ps. fluorescens*.



**Figura 3.** Inactivación de *S. aureus* inoculado en queso fresco (●) y agua de peptona al 0,5% de NaCl (■) bajo tiempos comunes de tratamiento (a) 1, (b) 3, (c) 5, (d) 7 min

### **Modelización matemática.**

Los datos experimentales de las curvas de supervivencia se ajustaron al modelo de Weibull, que ha demostrado su idoneidad para interpretar curvas de supervivencia con colas en diferentes publicaciones científicas (Fernandez et al. 1999). Del ajuste de los datos se obtuvieron los parámetros de escala ( $b$ ) y de forma ( $n$ ). La tabla 1 muestra el valor de los parámetros para *Listeria monocytogenes*. Como se puede apreciar, no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el valor de  $b$  a presiones elevadas (400 y 450 MPa) para cada uno de los medios. Sin embargo, a presiones inferiores (300 y 350 MPa) se aprecian diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores obtenidos para el parámetro  $b$ , siendo ligeramente inferiores los valores en el medio de referencia, lo que indicaría una mayor resistencia de *L. monocytogenes* en dicha matriz en comparación con el queso fresco. En cuanto al efecto de la presión en el parámetro  $b$  se observó que los valores de este incrementan desde un 0,22 hasta 5,22 al incrementar la presión. Existe una relación entre el incremento de la presión y el parámetro  $b$  de tal manera que a mayor presión mayor es el parámetro de escala, lo que indica que al incrementar la presión de trabajo disminuye la resistencia. En todos los casos el valor del parámetro  $n$  fue inferior a 1, lo que indicó la presencia de colas en las curvas de supervivencia. Los valores obtenidos para  $A_f$  y  $B_f$  fueron relativamente cercanos a 1, lo que indica buen ajuste del modelo a los valores experimentales.

**Tabla 1.** Ajuste de datos experimentales al modelo de Weibull para *L. monocytogenes* tratada bajo diversas presiones.

Presión (MPa)	Medio	Modelo de Weibull				
		<i>b</i>	<i>n</i>	<i>A<sub>f</sub></i>	<i>B<sub>f</sub></i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
200	Agua peptona	0,23 (0,02)*	0,04 (0,03)	1,02	1,00	0,85
	Queso fresco	0,22 (0,02)	0,07 (0,03)	1,02	1,00	0,86
300	Agua peptona	0,22(0,02)	0,34 (0,03)	1,01	1,00	0,95
	Queso fresco	0,28 (0,03)	0,51 (0,08)	1,02	1,00	0,95
350	Agua peptona	1,47 (0,07)	0,57 (0,07)	1,04	1,02	0,90
	Queso fresco	1,69 (0,03)	0,65 (0,05)	1,05	1,04	0,88
400	Agua peptona	3,20 (0,11)	0,37 (0,02)	1,01	1,00	0,97
	Queso fresco	3,05 (0,17)	0,41 (0,04)	1,01	1,00	0,98
450	Agua peptona	5,22 (0,07)	0,11 (0,01)	1,00	1,00	0,99
	Queso fresco	5,08 (0,13)	0,11 (0,02)	1,00	1,00	0,99

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

En la tabla 2 se pueden apreciar los valores de los parámetros *b* y *n* para *Ps. fluorescens*. Al analizar los resultados de *b* se observa que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las matrices en estudio (agua peptona al 0,5% NaCl y queso fresco) para todas las presiones de trabajo. Los valores para *A<sub>f</sub>* y *B<sub>f</sub>* fueron cercanos a 1, lo que indica la fiabilidad del ajuste de los datos experimentales al modelo de Weibull. El comportamiento del parámetro *b* frente al incremento de la presión sigue el mismo patrón que el descrito anteriormente para *L. monocytogenes* donde una mayor intensidad del tratamiento produjo valores superiores de *b*, lo que se puede interpretar como una disminución de la barorresistencia. Como en el caso de *Listeria monocytogenes*, el valor del parámetro de escala (*n*) es inferior a 1 en todos los casos ensayados, indicando la presencia de colas en las curvas de supervivencia.



**Tabla 2.** Ajuste de datos experimentales al modelo de Weibull para *Ps. fluorescens* tratada bajo diversas presiones.

Presión (MPa)	Medio	Modelo de Weibull				
		<i>b</i>	<i>n</i>	<i>Af</i>	<i>Bf</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
200	Agua peptona	0,24 (0,10)*	0,04 (0,03)	1,02	1,00	0,85
	Queso fresco	0,12 (0,03)	0,48 (0,08)	1,02	1,02	0,93
300	Agua peptona	0,16 (0,03)	0,34 (0,03)	1,01	1,00	0,95
	Queso fresco	0,10 (0,04)	0,43 (0,03)	1,01	1,01	1,00
350	Agua peptona	1,07 (0,10)	0,57 (0,07)	1,04	1,02	0,90
	Queso fresco	0,94 (0,12)	0,46 (0,09)	1,03	1,03	0,93
400	Agua peptona	3,15 (0,08)	0,37 (0,02)	1,01	1,00	0,97
	Queso fresco	2,98 (0,09)	0,41 (0,02)	1,00	1,00	0,99
450	Agua peptona	6,27 (0,07)	0,11 (0,01)	1,00	1,00	0,99
	Queso fresco	6,25 (0,14)	0,03 (0,02)	1,00	1,00	0,99

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

La tabla 3 muestra los valores para los parámetros de escala (*b*) y de forma (*n*) de *S. aureus* en ambas matrices estudiadas. Para observar una reducción significativa en *S. aureus* fue necesario incrementar la presión de tratamiento hasta los 550 MPa. En cuanto al ajuste de los resultados experimentales al modelo de Weibull, este se realizó para todas las presiones estudiadas como se observa en la tabla 3. Solo hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar las dos matrices para las presiones de 200 y 300 MPa, donde los valores de *b* en el queso fresco fueron significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) a los del medio de referencia 0,5% NaCl, lo que puede indicar una cierta protección del microorganismo en el queso fresco. Presiones superiores a 300 MPa no produjeron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de *b* obtenidos

para cada uno de los medios estudiados. Los valores del parámetro cinético  $b$  se incrementaron paulatinamente con el aumento de la presión de tratamiento, por lo tanto hay una reducción mayor en las cinéticas de inactivación a presiones más elevadas. Esta tendencia se presentó para las dos matrices de estudio. Los valores del parámetro de forma  $n$  muestran la formación de colas en las curvas de inactivación microbiana, ya que todos sus valores de ajuste fueron menor de 1. En el caso de los  $A_f$  y  $B_f$ , aunque los valores fueron relativamente cercanos a 1 cabe destacar que los valores ajustados variaron ligeramente, esto en comparación con los resultados presentados anteriormente.

**Tabla 3.** Ajuste de datos experimentales al modelo de Weibull para *S. aureus* tratado bajo distintos niveles de presión

Presión (MPa)	Medio	Modelo de Weibull				
		$b$	$n$	$A_f$	$B_f$	$R^2$
200	Agua peptona	0,13 (0,02)*	0,20 (0,14)	1,05	1,06	0,80
	Queso fresco	0,09 (0,02)	0,21 (0,09)	1,03	1,01	0,84
300	Agua peptona	0,26 (0,01)	0,08 (0,02)	1,02	1,03	0,83
	Queso fresco	0,12 (0,02)	0,28 (0,08)	1,02	1,00	0,89
350	Agua peptona	0,10 (0,02)	0,76 (0,09)	1,06	1,06	0,88
	Queso fresco	0,07 (0,02)	0,76 (0,09)	1,02	1,00	0,96
400	Agua peptona	0,19 (0,02)	0,62 (0,05)	1,02	1,01	0,94
	Queso fresco	0,17 (0,05)	0,74 (0,20)	1,06	1,05	0,86
450	Agua peptona	0,23 (0,01)	0,60 (0,05)	1,02	1,01	0,94
	Queso fresco	0,21 (0,04)	0,66 (0,12)	1,05	1,04	0,94
500	Agua peptona	0,48 (0,04)	0,55 (0,06)	1,08	1,01	0,94
	Queso fresco	0,55 (0,06)	0,64 (0,07)	1,01	1,00	0,97
550	Agua peptona	2,11 (0,06)	0,26 (0,02)	1,01	1,00	0,97
	Queso fresco	2,24 (0,12)	0,23 (0,04)	1,01	1,00	0,96

\*Números en paréntesis indican la desviación estándar

### **Análisis fisicoquímicos del queso fresco.**

Para el análisis fisicoquímico se utilizaron dos presiones de trabajo (350 y 400 MPa) que se eligieron en función de consideraciones microbiológicas y de aspecto general después de la presurización con tiempos de presurización de 1 a 7 minutos. La tabla 4 muestra los valores para el queso fresco procesado a la presión de 350 MPa. Los valores de  $a_w$  de las muestras no procesadas fueron de 0,971 y 0,973, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la muestra sin tratar y la tratada a diferentes tiempos. Sin embargo, los tratamientos de HHP alteraron ligeramente los valores iniciales de pH. Estas modificaciones se produjeron únicamente para los tiempos de 1 y 3 min, ya que a los 5 y 7 min no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) comparadas con la muestra no procesada por HHP. Estos resultados concuerdan con lo indicado por Okpala et al. (2010) en queso fresco a una presión de tratamiento de 250 MPa durante 5 minutos, obteniendo un 37% de variación frente al control no tratado. Este comportamiento se puede deber a los cambios en estado conformacional de las proteínas lácteas bajo los tratamiento de HHP.

Para el análisis de color se evaluaron los cambios producidos en los parámetros  $L^*a^*b^*$  así como la diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) entre las muestras no tratadas y cada una de las muestras de queso tratadas por HHP. Los resultados indican que las condiciones de tratamiento con tiempos superiores a 3 min y 350 MPa modifican los valores de los parámetros a 5 y 7 min de tratamiento disminuyendo el valor de  $L^*$  (70,81 y 70,55 respectivamente) frente al control no tratado (74,53). Adicionalmente, estos tiempos modificaron significativamente ( $p < 0,05$ ) los valores de  $a^*$  (componente verde - rojo) y  $b^*$  (componente amarillo - azul), produciéndose tanto un incremento en tonos verdosos como un incremento en

la tonalidad de amarillos. Este efecto del tiempo de tratamiento se aprecia con los resultados obtenidos para  $\Delta E^*$  donde a los mayores tiempos (5 y 7 min) se obtuvieron valores mayores de 3, lo que indica que las diferencias de color son obvias para el ojo humano.

**Tabla 4.** Resultados experimentales de los parámetros de  $a_w$ , pH, color para queso fresco tratado a 350 MPa.

Tiempo (min)	$a_w$	pH	Color			
			L*	a*	b*	$\Delta E$
0*	0,973 (0,001)a	5,54 (0,03)a	74,53 (0,35)a	-1,24 (0,03)a	9,75 (0,18)a	0,00
1	0,972 (0,001)a	5,59 (0,02)b	74,45 (0,27)a	-1,22 (0,05)a	10,03 (0,20)ab	0,08
3	0,973 (0,000)a	5,73 (0,03)c	74,40 (1,02)a	-1,24 (0,08)a	10,21 (0,34)abc	0,48
5	0,972 (0,001)a	5,51 (0,01)a	70,81 (0,53)b	-1,64 (0,03)b	10,37 (0,19)bc	3,79
7	0,971 (0,002)a	5,50 (0,01)a	70,55 (0,55)b	-1,60 (0,02)b	10,40 (0,11)c	4,04

\*Tiempo cero, queso fresco sin tratar por HHP

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Los números con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba LSD.

El comportamiento de los parámetros ( $a_w$ , pH, color), a 400 MPa se pueden observar en la tabla 5. En el caso de la  $a_w$  no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre cada una de las muestras tratadas a diferentes tiempos y el control no tratado por HHP, por lo que se puede decir que los valores de  $a_w$  no se vieron afectados ni por el incremento en el tiempo de tratamiento ni por la presión de trabajo. El valor de pH del queso fresco tratado por presión presentó un comportamiento similar a lo indicado anteriormente para el tratamiento a 350 MPa, produciéndose incrementos en los valores iniciales de pH seguido de una estabilización. Como se indicó anteriormente, este

comportamiento se puede deber a los cambios en estado conformacional de las proteínas lácteas bajo los tratamientos de HHP. Estos resultados concuerdan con lo indicado en diferentes tipos de quesos Cheddar (Ozturk et al. 2013; Rynne et al. 2008), Gouda (Messens et al. 2000), Mozzarella (Johnston & Darcy, 2000; Sheehan et al. 2005). Okpala et al. (2010) determinaron las combinaciones de presión, tiempo y temperatura que podían producir modificaciones en la red proteica que retiene el agua, lo que implicaría modificaciones en el valor de pH. Rynne et al. (2008) y Sheehan et al. (2005) propusieron que este incremento en el pH después del tratamiento por alta presión se puede deber al incremento en la disociación de grupos ionizables de las proteínas (grupos carboxilo), lo que conduce a una modificación de la concentración de los iones de hidrógeno libres, presentes en el queso fresco. El efecto del tratamiento por HHP y el incremento del tiempo de tratamiento sobre las características de color se hacen evidentes en el comportamiento del parámetro  $L^*$ , donde incrementos en el tiempo de tratamiento supusieron una disminución significativa del componente blanco en comparación con el control no tratado por HHP, siendo máximo el efecto a los 7 min de tratamiento. Los valores de  $a^*$  (componente verde - rojo) también se modificaron al incrementar el tiempo de tratamiento, produciéndose un incremento en los tonos verdosos. El parámetro  $b^*$  (componente amarillo - azul) también se vio afectado al aumentar el tiempo de tratamiento con incrementos en las tonalidades amarillentas. El efecto de las HHP sobre el color en diferentes tipos de queso ha sido estudiado por Koca et al. (2011) y Rynne et al. (2008), observando para un tratamiento de 400 MPa durante 5 min resultados similares a los del presente estudio. Al incrementar tanto el tiempo como la presión se producían cambios en los parámetros de color  $L^*a^*b^*$ . Los valores de  $\Delta E^*$  para

los resultados obtenidos a 1 min de tratamiento indican que el ojo humano puede apreciar diferencias mínimas de color dependiendo del ángulo de visión, mientras que para los tiempos de tratamiento superiores a 1 min las diferencias de color son obvias para el ojo humano. El incremento en la presión de trabajo de 350 a 400 MPa supuso igualmente un aumento en los cambios de color del queso fresco.

**Tabla 5.** Resultados experimentales de los parámetros de  $a_w$ , pH, color para queso fresco tratado a 400 MPa.

Tiempo (min)	$a_w$	pH	Color			
			L*	a*	b*	$\Delta E$
0*	0,969 (0,001)a	5,38 (0,02)a	74,04 (0,14)a	-1,33 (0,05)a	9,94 (0,16)a	0,00
1	0,968 (0,002)a	5,57 (0,01)b	72,35 (0,69)b	-1,50 (0,07)b	9,71 (0,30)a	1,72
3	0,967 (0,001)a	5,48 (0,01)c	71,50 (1,02)b	-1,45 (0,09)b	13,40 (0,85)b	4,30
5	0,969 (0,001)a	5,43 (0,03)a	71,04 (0,73)b	-1,51 (0,05)b	13,86 (0,03)b	4,94
7	0,969 (0,005)a	5,39 (0,03)a	69,53 (0,33)c	-1,48 (0,02)b	14,80 (0,15)c	6,64

\*Tiempo cero, queso fresco sin tratar por HHP

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Los números con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba LSD.

En las tablas 6 y 7 se puede observar el valor de los parámetros relacionados con la textura. Se analizó el comportamiento de 6 características principales de interés para el presente estudio y para su posterior escalado a nivel industrial. En cuanto al comportamiento del queso fresco tratado bajo la presión de 350 MPa (tabla 6) se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control no tratado y cada uno de los tiempos estudiados. A partir de los 5 min de tratamiento se observan reducciones en los valores de los parámetros de dureza, masticabilidad y recuperación. Estos resultados concuerdan con lo indicado por

Ozturk et al. (2013); Messens et al. (2000) y O'Reilly et al. (2000), quienes al tratar queso Mozzarella, Gouda y Cheddar, a presiones entre 50 a 400 MPa el parámetro de dureza varió significativamente a medida que se incrementó la intensidad del tratamiento. En cuanto al comportamiento del resto de parámetros (adhesividad, cohesividad, gomosidad), al incrementar el tiempo de tratamiento por encima de 3 minutos bajo la misma presión de proceso (350 MPa) se produjeron incrementos de los valores con respecto al control no tratado por HHP.

**Tabla 6.** Análisis de los parámetros de TPA para queso fresco a 350 MPa y diferentes tiempos de tratamiento.

Tiempo (min)	Dureza (g)	Adhesividad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad (g)	Recuperación
0*	2573,52 (327,61)a	-79,02 (8,03)a	0,75 (0,03)a	2094,56 (151,41)a	1831,54 (258,71)a	0,39 (0,03)a
1	2300,18 (253,96)a	-89,35 (6,93)ab	0,76 (0,04)a	1812,05 (112,72)a	1725,44 (157,57)a	0,37 (0,01)a
3	2134,46 (216,26)ab	-82,82 (7,38)ab	0,71 (0,03)a	1867,42 (102,18)a	1447,71 (198,89)ab	0,34 (0,02)a
5	2025,03 (181,64)b	-96,31 (8,35)bc	0,83 (0,02)b	2429,03 (86,83)b	1407,72 (110,70)b	0,31 (0,02)b
7	2010,50 (109,84)b	-99,86 (5,12)c	0,89 (0,02)c	2574,90 (149,60)b	1241,10 (141,88)b	0,28 (0,02)b

\*Tiempo cero, queso fresco sin tratar por HHP

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Los números con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba LSD.

Los resultados obtenidos para el queso fresco tratado a 400 MPa para los diversos tiempos de trabajo se pueden observar en la tabla 7. El comportamiento de los parámetros de TPA fue similar a lo descrito anteriormente para la presión de 350 MPa. Se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a partir de los 3 min de tratamiento y nuevamente los valores de dureza, masticabilidad y recuperación disminuyeron a medida que se incrementó el tiempo de tratamiento, siendo inferiores en todos los caso a la muestra de queso no tratada

por HHP. La cohesividad y gomosidad aumentaron al incrementar el tiempo de tratamiento. En cuanto a la adhesividad se observó que al aumentar el tiempo de tratamiento se elevó su valor respecto al control no procesado por HHP. Al comparar las presiones de trabajo se observó que la presión de 400 MPa produjo mayores variaciones en los parámetros de TPA que la presión de 350 MPa con respecto a la muestra sin tratar.

**Tabla 7.** Análisis de los parámetros de TPA para queso fresco a 400 MPa y diferentes tiempos de tratamiento.

Tiempo (min)	Dureza (g)	Adhesividad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad (g)	Recuperación
0*	2573,52 (327,61)a	-79,02 (8,03)a	0,75 (0,03)a	2094,56 (151,41)a	1831,54 (258,71)a	0,39 (0,03)a
1	2214,26 (204,22)ab	-116,23 (20,40)b	0,74 (0,01)a	1635,59 (234,05)b	1434,33 (207,38)ab	0,35 (0,01)ab
3	2106,55 (100,58)b	-124,82 (17,13)b	0,84 (0,02)b	2529,11 (89,67)c	1414,64 (112,03)b	0,34 (0,01)b
5	2019,34 (125,74)bc	-137,21 (15,47)b	0,91 (0,01)c	2629,75 (180,87)c	1318,09 (57,87)b	0,32 (0,03)bc
7	1893,10 (110,84)c	-120,68 (16,70)b	0,93 (0,03)c	2684,60 (164,01)c	1010,08 (111,01)c	0,30 (0,02)c

\*Tiempo cero, queso fresco sin tratar por HHP

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Los números con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba LSD.

## CONCLUSIONES

Este estudio demuestra la capacidad de las Altas Presiones Hidrostáticas para la reducción de la carga microbiana de microorganismos patógenos y alteradores en queso y pone de manifiesto la necesidad de evaluar las características propias de cada matriz a tratar, con la finalidad de obtener resultados óptimos de inactivación microbiana especialmente para tratamientos inferiores a 400 MPa. Los microorganismos inoculados (*L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*) en



medios complejos (queso fresco) fueron menos resistentes a los tratamientos por HHP que aquellos tratados en un medio simple (agua peptona 0,5% NaCl). Sin embargo, para *S. aureus* la matriz compleja supuso una barrera frente a las HHP, indicando por tanto una cierta protección del medio a los organismos tratados por altas presiones. Los resultados obtenidos para cada uno de los medios variaron dependiendo directamente de las características del proceso (tiempo-presión). Estos resultados pueden ser de gran ayuda para la industria quesera en el momento del diseño de tratamientos por HHP. De acuerdo a los resultados del presente estudio el modelo de Weibull puede interpretar correctamente los datos experimentales de inactivación para *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* inoculados en diversas matrices. Al evaluar los resultados fisicoquímicos y los diferentes parámetros de TPA en el queso fresco después de los tratamientos de HHP se pudo determinar que un incremento en el tiempo de presurización produjo un aumento de los colores amarillo y verde al igual que de los valores de adhesividad, cohesividad y gomosidad; sin embargo, se produjo una disminución significativa del color blanco, dureza, masticabilidad y recuperación del queso fresco. Estas variaciones de la matriz alimentaria inicial pueden llegar a ser de gran interés para la industria alimentaria, ya que pueden ser aprovechadas para generar nuevas texturas de gran interés industrial.

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer al Instituto Alpina de Investigación (IAI) los fondos necesarios para realizar el presente trabajo y al IATA (CSIC) por sus instalaciones.

## REFERENCIAS

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., & Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4248-4251.
- Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J., & Orlie, V. (2012). High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat science*, 90(3), 690-696.
- Bodart, M., De Peñaranda, R., Deneyer, A., & Flamant, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43(12), 2046-2058.
- Carlez, A., Rosec, J. P., Richard, N., & Cheftel, J. C. (1993). High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 26(4), 357-363.
- Centers for Disease Control and Prevention Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010; 59:418–22
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2012). Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 248-253.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2014). Commercial application of high-pressure processing for increasing starter-free fresh cheese shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 498-505.
- Evrendilek, G. A., Koca, N., Harper, J. W., & Balasubramaniam, V. M. (2008). High-pressure processing of Turkish white cheese for microbial inactivation. *Journal of Food Protection*, 71(1), 102-108.
- Food and Drug Administration (FDA). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition. [*Staphylococcus aureus*, 87]. 2012.

Fernandez, A., Salmeron, C., Fernández, P. S., & Martinez, A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in food science & technology*, 10(4), 158-162.

Goh, E. L., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Buckle, K. A., & Fleet, G. H. (2007). Baroprotective effect of increased solute concentrations on yeast and moulds during high pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 535-542.

Johnston, D. E., and P. C. Darcy. (2000). The effects of high pressure treatment on immature Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft* 55:617–620.

Koca, N., Balasubramaniam, V. M., & Harper, W. J. (2011). High-Pressure Effects on the Microstructure, Texture, and Color of White-Brined Cheese. *Journal of food science*, 76(5), E399-E404.

Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Muguera, B., Moulay, L., & Fiszman, S. M. (2011). Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 729-736.

Martin, N. H., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of dairy science*, 94(6), 3176-3183.

Messens, W., D. Van de Walle, J. Arevalo, K. Dewettinck, and A. Huyghebaert. 2000. Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. *Int. Dairy J*, 10:359–367.

Moody, A., Marx, G., Swanson, B. G., Bermúdez-Aguirre, D. (2014). A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food Control*, 37: 305–314.

O'Flynn, C. C., Cruz-Romero, M. C., Troy, D. J., Mullen, A. M., & Kerry, J. P. (2014). The application of high-pressure treatment in the reduction of phosphate levels in breakfast sausages. *Meat science*, 96(1), 633-639.

Okpala, C.O.R.; Piggott, J. R.; Schaschke, C.J. 2010. Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. *Innovative Food*

Science and Emerging Technologies, 11: 61–67

O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Kelly, A. L., Beresford, T. P., & Murphy, P. M. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4890-4896.

Ozturk, M., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Houck, K., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2013). Effect of various high-pressure treatments on the properties of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of dairy science*, 96(11), 6792-6806.

Rynne, N. M., T. P. Beresford, T. P. Guinee, E. Sheehan, C. M. Delahunty, and A. L. Kelly. 2008. Effect of high-pressure treatment of 1 day-old full-fat Cheddar cheese on subsequent quality and ripening. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 9:429-440.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2011 [July 28, 2014]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

Sheehan, J. J., Huppertz, T., Hayes, M. G., Kelly, A. L., Beresford, T. P., & Guinee, T. P. (2005). High pressure treatment of reduced-fat Mozzarella cheese: Effects on functional and rheological properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 73-81.

Smiddy, M., O'Gorman, L., Sleator, R. D., Kerry, J. P., Patterson, M. F., Kelly, A. L., & Hill, C. (2005). Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 83-90.

Torres, E. F., González-M, G., Klotz, B., & Rodrigo, D. (2015). Effects of high hydrostatic pressure and temperature increase on *Escherichia coli* spp. and pectin methyl esterase inactivation in orange juice. *Food Science and Technology International*, 1082013215582107.

Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C., & Michiels, C. W. (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International journal of food microbiology*,

88(1), 1-9.

US Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2015). USDA Cheese Production and Consumption: Summary for Selected Countries, Retrieved 10 September, 2015 from the FAS's PSD Online data Home Page on the World Wide Web: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>

# CAPÍTULO IV

## **Revalorización del lactosuero de queso como coadyuvante en la gelificación de aislado proteico de suero lácteo (WPI) mediante Altas Presiones Hidrostáticas.**

Torres, E.F<sup>a</sup>., González-M, G<sup>b</sup>., Klotz, B<sup>b</sup>., Martínez, A<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos  
Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico  
46980 Paterna (Valencia)  
Spain.

<sup>b</sup> Alpina Research Institute (IAI), Alpina Productos Alimenticios S.A  
Edificio Corporativo Km 3 vía  
251001 Briceño-Sopó (Cundinamarca)

Torres, E.F., González-M, G., Klotz, B, Martínez, A. 2016. Valorización del suero residual de queso en la gelificación de aislado proteico de suero lácteo (WPI) mediante altas presiones hidrostáticas. Enviado a: Food Hydrocolloids

## **RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la revalorización del suero líquido del proceso de producción del queso fresco mezcla de vaca-oveja enriquecido con aislado de proteína (WPI) para obtener geles de interés industrial con un elevado contenido proteínico utilizando tratamientos de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP). Se analizaron las variaciones en los parámetros de pH, color, textura (TPA) y la capacidad de retención de agua de los geles obtenidos, durante un almacenamiento de 28 días a temperaturas de refrigeración de 4 °C. Las diversas mezclas de suero de queso junto con los porcentajes WPI procesadas por HHP dieron lugar a geles con características específicas. Los valores de pH, color ( $L^*a^*b^*$ ) variaron ligeramente dependiendo directamente de la concentración de WPI y del tiempo de almacenamiento. Los valores de dureza y gomosidad sufrieron modificaciones dependiendo del medio líquido (suero de queserías o agua) y de la concentración de WPI. La utilización de suero de queso para la formación del gel favoreció la retención de agua, reduciendo significativamente la sinéresis en refrigeración. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una posible reutilización y revalorización del suero de queso generado en las industrias queseras mezclado con WPI proporcionando geles con un elevado valor biológico utilizando tecnologías no térmicas como las altas presiones para su producción.

## **INTRODUCCIÓN**

En los últimos años el mercado de productos enriquecidos con proteínas ha presentado un gran auge, lo que ha llevado a profundizar en el estudio y utilización de proteínas que presentan un elevado valor biológico. Estas

investigaciones se realizan con la finalidad de desarrollar nuevos productos que cumplan con las altas exigencias de los compradores actuales. En cuanto al tratamiento por HHP se ha observado en diversos estudios que esta tecnología modifica la estructura de las proteínas, desestabiliza membranas celulares y elimina microorganismos patógenos y alteradores presentes comúnmente en los alimentos (Cheftel, 1992; Torres et al. 2015; Totosaus et al. 2002). En general, las Altas Presiones Hidrostáticas se han utilizado como método de conservación no térmico, sin embargo también tienen un gran potencial para la obtención de nuevos productos dada su capacidad para modificar las estructuras proteicas. Las proteínas provenientes de la leche y derivados lácteos se pueden dividir en dos grandes categorías. La primera de ellas es la caseína, que corresponde a un 80%, y las proteínas del suero, que son aproximadamente un 20%. La caseína se utiliza tradicionalmente en la industria alimentaria como coadyuvante alimentario o para la fabricación de quesos con procesos de separado de las fracciones de caseína-suero mediante la modificación del pH hasta los puntos isoeléctricos de las caseínas o por la adición de enzimas. En cuanto a la fracción suero, esta se compone principalmente de diferentes proteínas globulares. Entre las más comunes y que presentan un mayor porcentaje están las  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina e inmunoglobulinas. Cabe destacar que la composición del suero lácteo varía dependiendo del proceso de obtención del queso o precipitado de la caseína, ya que los sueros ácidos en comparación con los sueros dulces contienen menores porcentajes de proteína, lactosa y lípidos; sin embargo, presentan mayores niveles de sodio, potasio, calcio, sodio, magnesio (Lucey, 2014; Oakenfull et al. 1997).



El suero lácteo procedente de queserías representa un gran problema medioambiental debido a su alto contenido de sólidos solubles y gran volumen que supone en la producción de quesos. Según Kosikowski (1979) y Božanić et al. (2014) en la producción de 1kg de queso, duro-semiduro, se generan 9 L de suero. En estudios previos realizados por Baldasso et al. (2011); OECD-FAO (2012) y Smithers (2008) se estimó que la producción de suero de queso ronda los 160 a 190 millones de toneladas/año, de las cuales únicamente el 50% se reutiliza a nivel mundial. El suero generado por el proceso de obtención del queso presenta valores elevados de demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) en el intervalo de 40.000 a 60.000 y 50.000 a 80.000 ppm, respectivamente (Saddoud et al. 2007; Ben-Hassan et al. 1994). Los diversos procesos actuales de recuperación de las proteínas pueden disminuir la DQO hasta valores entorno a los 10.000 ppm (Guimarães et al. 2010; Siso, 1996). Según estudios realizados por Siso (1996), cerca del 50% de este suero generado en las industrias lácteas se utilizaba para alimentación animal y un pequeño porcentaje, para consumo humano (helados, postres, tartas, derivados lácteos), por lo que varios autores han estudiado el efecto de las HHP sobre las proteínas del suero lácteo utilizando diversas matrices con variación en las concentraciones de proteínas (Patel et al. 2005; Michel et al. 2001; Olsen et al. 1999). Igualmente se ha descrito que este tipo de tratamientos de presurización alteran de forma significativa la estructura terciaria de las proteínas, lo que permite una interacción directa de las proteínas presentes en el suero lácteo (Patel & Huppertz, 2014). Según Boonyaratanakornkit et al. (2002) y Devi et al. (2013) los tratamientos de HHP pueden llegar a modificar enlaces débiles (fuerzas de van der Waals, fuerzas hidrofóbicas, puentes de

hidrógeno), sin embargo los enlaces covalentes presentes en la estructura primaria de las proteínas no suelen sufrir modificaciones por los tratamientos de presurización. Cabe destacar que la desnaturalización de las proteínas por presión varía dependiendo directamente del grado de solvatación. Estudios llevados a cabo con anterioridad han indicado que el efecto de las HHP sobre las proteínas se ve alterado por factores del proceso como el tiempo, pH, temperatura, tipo de proteína (Huppertz et al. 2004; López-Fandiño 2006; Yang et al. 2001).

La  $\beta$ -lactoglobulina parece ser la proteína principal que interviene en la gelificación cuando se somete a alta presión el suero lácteo (López-Fandiño 2006; Considine et al. 2007). Esta proteína del suero lácteo presenta la mayor sensibilidad a los procesos de HHP. La  $\alpha$ -lactoalbúmina presenta una mayor resistencia a la desnaturalización proteica por tratamientos de HHP comparado con la  $\beta$ -lactoglobulina (McGuffey et al. 2005; Tanaka & Kunugi, 1996; Tanaka et al. 1996; Patel & Huppertz, 2014). McGuffey et al. (2005) demostraron que presiones de 200 MPa producían un efecto reversible de la  $\alpha$ -lactoalbúmina tratada por HHP y que un incremento de la presión a 400 MPa se tradujo en pérdida de la estructura nativa de la proteína. Sin embargo, en el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina se consiguió el mismo efecto que el mencionado anteriormente con tratamientos entre 50 y 150 MPa (Stapelfeldt & Skibsted, 1999; Considine et al. 2005).

En general, los trabajos en los que se ha usado la Alta Presión Hidrostática con proteína de suero lácteo se han llevado a cabo usando aislado de proteína en polvo, obtenida por algún proceso de concentración como la ultrafiltración, resuspendida en agua, lo que requiere usar porcentajes de proteína de alrededor

del 12%. El objetivo del estudio fue analizar la revalorización del suero líquido del proceso de producción del queso fresco mezcla de vaca-oveja enriquecido con aislado de proteína (WPI) para obtener geles de gran interés industrial por su alto contenido proteico mediante la utilización de las Altas Presiones Hidrostáticas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El suero de queso se obtuvo directamente de una industria productora de queso fresco mezcla de vaca y oveja situada en Valencia (España). Las muestras de suero se refrigeraron a  $4 \pm 2$  °C durante el transporte hasta los laboratorios, donde se congelaron a -40 °C. El aislado de proteína láctea (WPI) se obtuvo de Best protein S.L. (Barcelona, Spain). Este contenía un 43-48% de  $\beta$ -lactoglobulina y un 14-18 % de  $\alpha$ -lactoalbúmina.

### **Preparación muestras**

El suero líquido procedente de queso refrigerado a  $4 \pm 2$  °C se mezcló en un vaso de precipitado con el aislado de proteína láctea (WPI) en diversas proporciones (5, 7, 11, 15% p/v). La mezcla obtenida se homogenizó durante 10 min utilizando un agitador magnético a temperatura ambiente (25 °C). Una vez finalizada la dispersión del WPI en el suero de queso se adicionó un 0.25% p/v de cloruro de sodio (NaCl) y 0.15 % p/v cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), esto con la finalidad de incrementar las fuerzas iónicas del gel. El pH de los medios líquidos se ajustó a un valor final de 8. Para el control se utilizó agua destilada en lugar de suero de queso y se siguió el mismo procedimiento de preparación descrito anteriormente. El seguimiento y evaluación de los diversos parámetros

fisicoquímicos se llevó a cabo durante 28 días tomando 5 puntos de control (1, 7, 14, 21, 28 días).

### **Tratamiento HHP**

Para los procesos de presurización se utilizaron tres muestras independientes envasadas en bolsas de polietileno metalizadas y termoselladas (MULTIVAC, Thermosealer). Una vez presurizadas las muestras se procedió al análisis de sus propiedades fisicoquímicas (textura, color, sinéresis). El tratamiento por HHP se llevó a cabo utilizando una mezcla de agua con etilenglicol como agente presurizante. La temperatura se controló utilizando una camisa de refrigeración, conectada a un criostato para mantener la temperatura constante durante el experimento. El tiempo de despresurización fue menor a 1 minuto en todas las experiencias. La temperatura inicial del tratamiento de HHP fue de 20 °C, obteniendo una temperatura final máxima de 38 °C a una presión de 550 MPa durante 10 min.

### **pH del gel**

El pH se midió directamente sobre los geles por medio de un pH-metro (Crison Basic 20+, Barcelona, España) calibrado a pH 4 y 7. El valor final de pH de los medios fue de 8. Este se ajustó justo antes de cada tratamiento de presurización. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y durante un total de 28 días.

### **Medida del Color en los geles**

El color del gel formado por HHP se determinó mediante un colorímetro Konica Minolta CM-3500d (Konica Minolta Sensing Inc., Japan). Este equipo

proporciona los valores de reflectancia, al igual que las coordenadas del sistema cromático uniforme CIELab:  $L^* = 0$  (negro),  $L^* = 100$  (blanco),  $a^*$  = color desde rojo (positivo) a verde (negativo) y  $b^*$  = color desde amarillo (positivo) a azul (negativo), el centro es acromático. La determinación se llevó a cabo sobre cubos de geles de 2 cm por cada cara. Se tomaron muestras a diferentes profundidades del gel. Las medidas se realizaron durante 28 días por triplicado a muestras de gel tratado por HHP. Igualmente se tomaron medidas de las muestras control (agua destilada) presurizadas (Bodart et al. 2008). El colorímetro se estandarizó utilizando una placa de calibración blanca antes de proceder a las medidas de los geles obtenidos por presurización, tanto para el suero líquido como para el control (agua destilada).

La diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) entre las muestras no tratadas y cada una de las muestras de geles tratadas por HHP se calculó siguiendo la ecuación 1 propuesta por Bodart et al. (2008)

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Los parámetros a seguir para determinar los posibles cambios de color en las muestras han sido descritos por Martínez-Cervera et al. (2011): Para  $\Delta E^* < 1$  las diferencias de color no son apreciadas por el ojo humano,  $1 < \Delta E^* < 3$  el ojo humano puede apreciar diferencias mínimas de color dependiendo del ángulo,  $\Delta E^* > 3$  las diferencias de color son obvias para el ojo humano.

## **Textura (TPA)**

Después del tratamiento por HHP, las muestras se mantuvieron en refrigeración a  $4 \pm 2$  °C. Los parámetros de textura se evaluaron durante 28 días a temperaturas de refrigeración. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando TA-XTplus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra). El análisis se llevó a cabo para los diversos geles, obtenidos después del tratamiento de HHP (control y suero líquido). Las muestras se cortaron en cubos de 2 cm por cada cara utilizando un molde metálico. Se utilizaron cinco réplicas para cada una de las muestras. La medición se llevó a cabo con un disco de compresión de aluminio de 75mm (P/75), velocidad de 1mm/s con tiempo de espera de 5s entre cada uno de los dos ciclos.

## **Medida de la sinéresis**

La sinéresis se midió mediante un test de centrifugación (Ribotta et al., 2007; 2012) usando una centrífuga Beckman J2-MI (Beckman Instruments, USA). Los geles obtenidos, tanto usando el suero de queso como para el control tratados por HHP, se evaluaron a lo largo de 28 días almacenados a  $4 \pm 2$  °C. Al cumplir el tiempo de almacenamiento los geles se atemperaron a 25 °C (temperatura ambiental) y se centrifugaron a 1500g durante 15 min y 25 °C. Después de la centrifugación el agua libre se separó, se pesó y el resultado se expresó como el porcentaje del total de agua presente en el los geles. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones de WPI tanto para muestra de suero de queso como para el control con agua destilada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evolución del pH

La tabla 1 muestra la evolución del pH durante el almacenamiento para las muestras con diversas concentraciones de WPI. Se puede observar que la evolución de los valores de pH fue similar para todos los días de almacenamiento. Estos resultados variaron ligeramente dependiendo del porcentaje adicionado de WPI en polvo, por tanto el almacenamiento no modificó en gran medida los valores iniciales de pH ajustados antes del tratamiento de presurización. Igualmente no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las concentraciones de WPI estudiadas.

**Tabla 1.** Evolución del pH de los geles con WPI control con agua (CG) y suero de queso (CW) obtenidos por HHP a lo largo de 28 días de almacenamiento.

Tiempo (días)	Muestra	% WPI	pH
1	CG	5	8,03(0,03)*
	CW		8,01(0,02)
	CG	7	8,02(0,01)
	CW		8,01(0,02)
	CG	11	8,01(0,01)
	CW		8,02(0,01)
	CG	15	7,97(0,02)
	CW		7,96(0,03)
7	CG	5	8,11(0,04)
	CW		8,09(0,03)
	CG	7	8,03(0,03)
	CW		8,09(0,02)
	CG	11	8,07(0,02)
	CW		8,05(0,01)
	CG	15	8,08(0,03)
	CW		

	CW		8,05(0,03)
	CG	5	8,14(0,05)
	CW		8,12(0,03)
	CG	7	8,05(0,01)
14	CW		8,07(0,02)
	CG	11	8,03(0,02)
	CW		8,05(0,01)
	CG	15	8,03(0,01)
	CW		8,01(0,03)
	CG	5	8,08(0,05)
	CW		8,05(0,01)
	CG	7	8,05(0,03)
21	CW		8,07(0,03)
	CG	11	8,01(0,02)
	CW		8,02(0,02)
	CG	15	7,98(0,03)
	CW		7,96(0,02)
	CG	5	8,01(0,04)
	CW		8,00(0,04)
	CG	7	8,01(0,02)
28	CW		8,01(0,02)
	CG	11	7,98(0,03)
	CW		7,96(0,04)
	CG	15	7,94(0,05)
	CW		7,97(0,05)

\* Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

### **Evolución del color**

Todos los geles obtenidos después del tratamiento de presurización a 500 MPa durante 10 min fueron de colores blanquecinos. La tabla 2 muestra la evolución de los parámetros de color para los distintos geles del estudio. Los valores de L\* fueron ligeramente superiores en los geles presurizados obtenidos para el



control (agua destilada) que en los geles obtenidos con el suero de queso, lo que indica que los geles control presentan un mayor componente blanco. En el caso del parámetro  $a^*$  (componente verde - rojo) los valores fueron más altos en las muestras que contenían el suero de queso dando lugar por tanto a mayores tonos verdosos, en comparación con los geles control obtenidos con agua. De la misma forma el parámetro  $b^*$  (componente amarillo - azul) siguió el comportamiento descrito anteriormente para  $a^*$  produciéndose incrementos significativos de las tonalidades amarillas en las muestras de gel con suero de queso. En cuanto al efecto del tiempo de almacenamiento frente al valor de  $L^*$  no se observa una tendencia definida, sin embargo cabe destacar que el comportamiento del color de los geles que contenían suero de queso fue mucho más estable que en los geles control obtenidos por presurización.

En cuanto a los valores obtenidos para la diferencia total de color ( $\Delta E^*$ ), se aprecian diferencias para los geles obtenidos por presurización entre la muestra control (agua destilada) y los geles con suero de queso, dando lugar a diferencias de color obvias para el ojo humano. Estas diferencias dependieron directamente tanto del porcentaje de WPI, de la matriz líquida y del tiempo de almacenamiento.

**Tabla 2.** Evolución de los parámetros de color para los geles control con agua (CG) y suero de queso (CW) procesados por HHP evaluados durante 28 días.

Tiempo (días)	Muestra	% WPI	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
1	CG	5	52,55 (0,37)aA	-0,45 (0,04)aA	0,74 (0,23)aA	3,78
	CW		48,82 (0,28)bA	-1,08 (0,02)bA	1,22 (0,16)bA	
	CG	7	51,32 (0,21)aA	-0,57 (0,04)aA	0,83 (0,15)aA	2,13
	CW		49,37 (0,90)bA	-1,07 (0,06)bA	1,69 (0,20)bA	
	CG	11	53,42 (0,31)aA	-0,49 (0,02)aA	1,49 (0,09)aA	6,45

	CW		47,06 (1,10)bA	-1,29 (0,08)bA	1,54 (0,21)aA	
	CG		50,79 (0,57)aA	-0,53 (0,02)aA	1,89 (0,22)aA	
	CW	15	50,83 (0,39)aA	-0,89 (0,03)bA	2,64 (0,05)bA	0,41
7	CG		49,91 (0,45)aB	-0,47 (0,04)aA	0,92 (0,13)aA	
	CW	5	51,11 (0,82)aB	-1,01 (0,01)bB	1,80 (0,18)bB	1,37
	CG		52,52 (0,12)aB	-0,49 (0,02)aB	0,93 (0,01)aA	
	CW	7	46,95 (0,36)bB	-1,08 (0,03)bA	1,86 (0,13)bA	5,61
	CG		52,38 (0,10)aB	-0,56 (0,05)aB	1,59 (0,02)aA	
	CW	11	51,93 (0,24)bB	-0,91 (0,02)bB	2,58 (0,10)bB	0,58
	CG		51,98 (0,28)aB	-0,69 (0,02)aB	2,12 (0,22)aA	
	CW	15	50,19 (0,05)bB	-0,93 (0,01)bA	2,46 (0,01)bB	1,82
14	CG		53,67 (0,05)aC	-0,56 (0,04)aB	1,40 (0,17)aB	
	CW	5	49,55 (0,09)bC	-1,08 (0,02)bA	1,66 (0,06)aC	4,15
	CG		51,41 (0,13)aA	-0,57 (0,02)aA	0,95 (0,02)aA	
	CW	7	46,15 (0,24)bC	-1,34 (0,01)bB	1,01 (0,02)aB	5,32
	CG		51,40 (0,11)aC	-0,61 (0,02)aC	1,02 (0,02)aC	
	CW	11	51,10 (0,13)bC	-0,96 (0,02)bC	2,59 (0,25)bC	0,46
	CG		52,57 (0,28)aC	-0,81 (0,03)aC	1,81 (0,06)aA	
	CW	15	48,33 (0,33)bC	-0,91 (0,01)bA	2,94 (0,27)bA	4,24
21	CG		52,34 (0,28)aA	-0,51 (0,03)aA	0,66 (0,08)aA	
	CW	5	48,74 (0,32)bA	-1,17 (0,05)bC	1,03 (0,09)bA	3,66
	CG		52,15 (0,16)aC	-0,52 (0,01)aA	0,73 (0,05)aA	
	CW	7	50,34 (0,08)bA	-1,04 (0,01)bA	1,80 (0,01)bA	1,88
	CG		50,69 (0,15)aD	-0,56 (0,02)aD	1,05 (0,02)aD	
	CW	11	45,66 (0,42)bA	-0,96 (0,01)bD	2,36 (0,05)bD	5,05
	CG		50,43 (0,43)aA	-0,57 (0,02)aA	1,53 (0,12)aB	
	CW	15	50,01 (0,14)aD	-0,98 (0,02)bB	2,63 (0,11)bA	0,65
28	CG		50,66 (0,15)aD	-0,54 (0,05)aA	0,53 (0,13)aA	
	CW	5	49,09 (0,60)bA	-1,06 (0,02)bA	1,39 (0,30)bA	1,71
	CG		50,86 (0,53)aA	-0,53 (0,02)aA	0,89 (0,08)aA	
	CW	7	48,92 (0,45)bA	-0,96 (0,08)bA	1,45 (0,16)bA	1,99
	CG		48,80 (0,46)aE	-0,71 (0,03)aE	0,80 (0,06)aE	
	CW	11	49,60 (0,61)aD	-1,05 (0,04)bE	1,93 (0,19)bE	0,88
	CG		48,92 (0,29)aD	-0,67 (0,03)aD	1,44 (0,07)aC	
	CW	15	48,83 (0,34)aE	-1,04 (0,03)bC	2,62 (0,29)bA	0,38

Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Los números con letras minúsculas diferentes dentro de la misma concentración y tiempo representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba LSD, mientras que las letras mayúsculas diferentes entre concentraciones indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba LSD entre tiempos de almacenamiento.

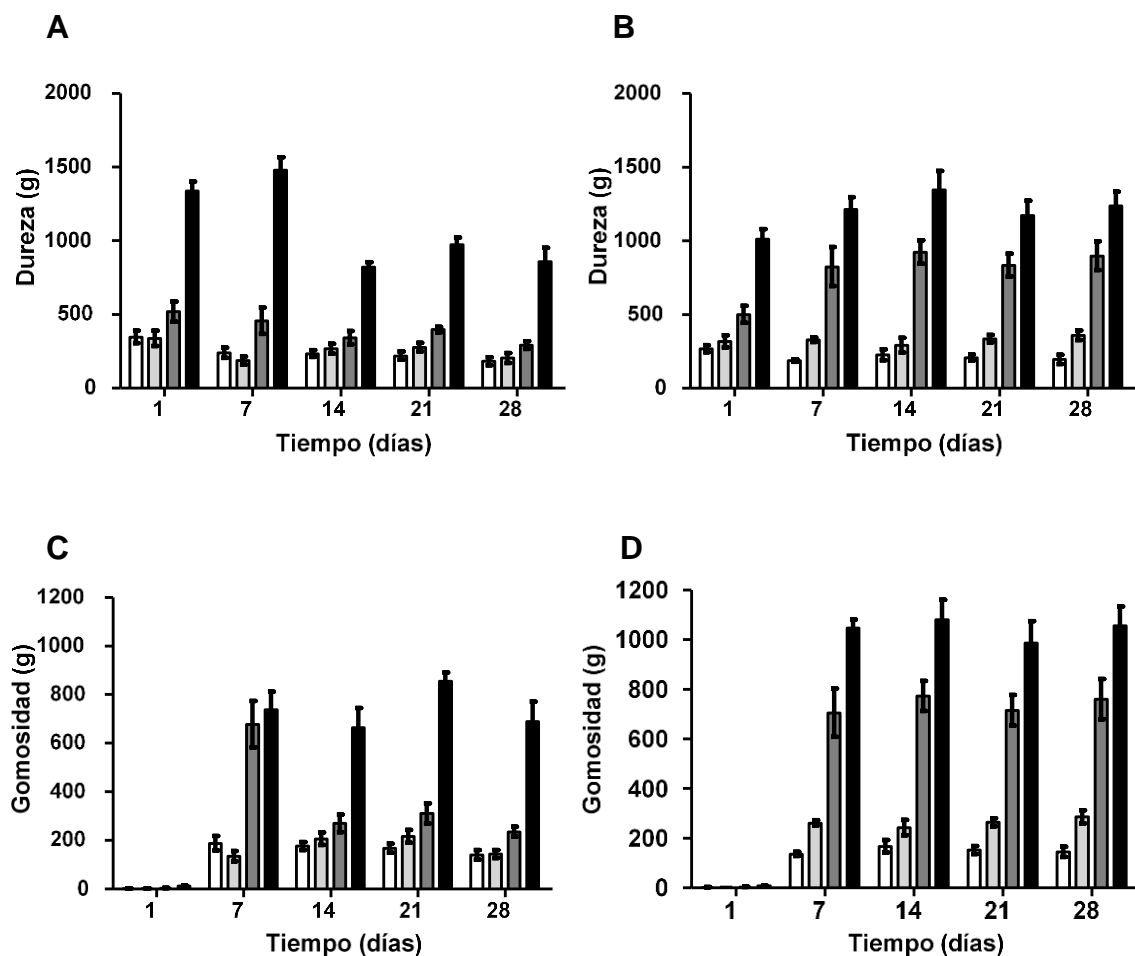
### **Análisis de textura.**

La figura 1 muestra los diversos parámetros de TPA obtenidos de las mediciones realizadas sobre los geles (control y suero de queso) considerando las diferentes concentraciones de WPI en polvo. Como se puede apreciar, al aumentar la concentración de WPI en los medios se incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) los valores de dureza y gomosidad desde el día 1 de almacenamiento. Estas diferencias se hicieron más perceptibles al superar el 7% de WPI. En cuanto a los geles control utilizando agua destilada, los valores de dureza fueron menos constantes durante el almacenamiento en refrigeración. Los mayores valores para la dureza se obtuvieron entre los días 1 a 7, sin embargo un incremento del tiempo de almacenamiento del gel hasta los 14 días supuso una caída significativa en la dureza para las concentraciones de 11 y 15% WPI. Para los porcentajes inferiores (5-7%) de WPI las variaciones del parámetro de dureza fueron mínimas durante el tiempo de evaluación. No obstante, los resultados obtenidos utilizando el suero lácteo no variaron con el tiempo de almacenamiento. Como se observa en la figura 1b, el incremento en la concentración de WPI dio lugar a un aumento progresivo de los valores de dureza. Esta tendencia se observó durante la totalidad del estudio obteniendo valores que no varían a partir del día 7 de almacenamiento. Los mayores valores de dureza se obtuvieron para la concentración de 15% de WPI. Estos valores

fueron disminuyendo progresivamente a medida que se redujo el porcentaje de WPI adicionado en el suero de queso.

Los geles control presentaron un comportamiento para la gomosidad similar al descrito para el parámetro de dureza. A medida que se incrementó el porcentaje de WPI presente en el medio los valores de gomosidad aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en los geles con las concentraciones de 5, 7, 11 % WPI. Con respecto al 15% de WPI, en el control los resultados no presentaron variación desde el día 7 de almacenamiento. Cabe destacar que la gomosidad varió con el tiempo de almacenamiento: su valor para el día 1 de almacenamiento fue muy inferior al obtenido para los días posteriores de análisis, lo que parece indicar que un incremento en el tiempo de almacenamiento eleva la gomosidad de los geles procesados por altas presiones.

Se observa que la gomosidad de los geles obtenidos utilizando el suero de queso se incrementó progresivamente a medida que se aumentó el porcentaje de WPI utilizado. Los niveles de gomosidad en los geles a base de suero de queso con un 11 y 15% de WPI fueron muy superiores a los del control con agua destilada. Para concentraciones inferiores (5-7% WPI) solo se aprecian ligeras diferencias en comparación al control. Los valores de gomosidad se mantuvieron estables a partir del día 7 de almacenamiento. Respecto al efecto del tiempo de almacenamiento sobre el parámetro de gomosidad, se observa que sigue el comportamiento descrito anteriormente para el control, donde se observó que el aumento en tiempo de almacenamiento modifica directamente las características de los parámetros.



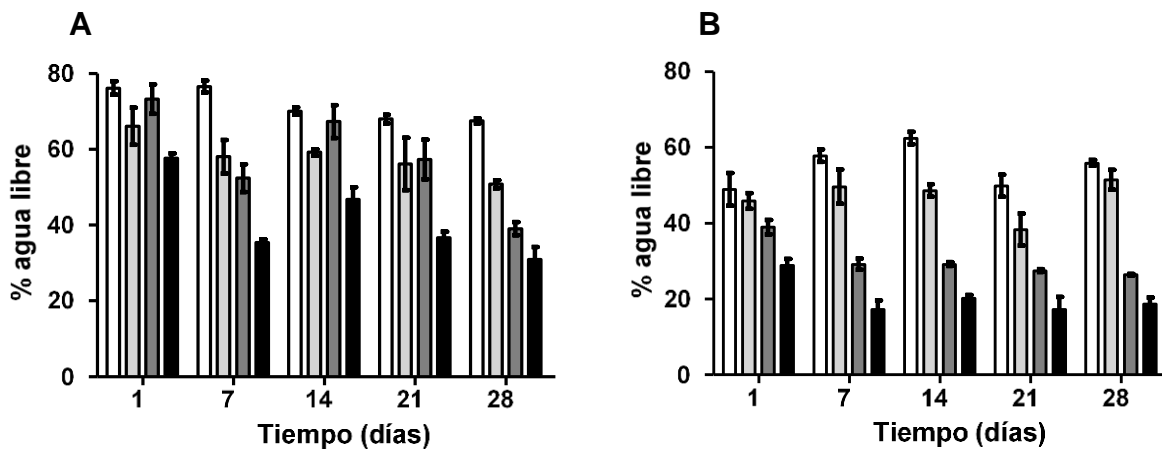
**Figura 1.** Evolución de la Dureza (A-B) y Gomosidad (C-D) para los geles control (A-C) y suero de queso (B-D), a concentraciones de (□) 5; (▒) 7; (▓) 11; (■) 15% p/v WPI con el tiempo de almacenamiento a 4 °C.

### Evaluación de sinéresis.

La evaluación de la pérdida de agua en los geles es de gran importancia en las diversas investigaciones, ya que establece la estabilidad del gel durante los diversos procesos de conservación o cambios de temperatura durante el almacenamiento. Según estudios llevados a cabo por otros autores (Ribotta & Rosell, 2010; Zheng & Sosulski, 1998) esta pérdida de agua se produce principalmente por la contracción espontánea de la red que conforma el gel, lo que conlleva una reorganización del agua retenida en el interior y, en el caso de

geles formados a partir de proteínas de suero lácteo de queso, esta gelificación se basa en la interacción entre  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina. Los resultados obtenidos por Kanno et al. (1998), con WPI en medio tampón fosfato sódico (pH 6,8) y presiones de 400-1000 MPa, sugieren que los puentes S-S entre  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina son los principales responsables de la formación de los geles cuando se someten a dichas presiones.

Los resultados obtenidos para las muestras control y los geles obtenidos con suero de queso se pueden observar en la figura 2. Los geles procesados con el suero de queso presentaron una menor liberación de agua a medida que se incrementó el porcentaje de WPI, obteniendo una liberación total de agua entre el 18,68; 38,95% para la concentración de 15-11%WPI respectivamente. La liberación de agua en las muestras control fue un 30,89 y 73,24% para las mismas concentraciones y condiciones de proceso. Este incremento en la liberación de agua contenida en el gel se puede atribuir a la pérdida espontánea de la capacidad de retención de agua. El resultado puede indicar que la adición de suero lácteo procedente de queserías favorece la retención de agua. En cuanto al comportamiento de los geles que contenían suero lácteo de queso, se observaron descensos significativos en los valores de sinéresis entre los días 1 y 7 con una posterior estabilización de la liberación de agua hasta finalizar el tiempo de almacenamiento de 28 días. Esta tendencia se puede observar para las concentraciones de 11-15% de WPI.



**Figura 2.** Evolución de la sinéresis para los geles control (A) y suero de queso (B), a concentraciones de (□) 5; (▨) 7; (▩) 11; (■) 15% p/v WPI con el almacenamiento a 4 °C.

## CONCLUSIONES

Las soluciones de suero lácteo con adición de WPI procesadas bajo HHP dieron lugar a geles con características fisicoquímicas que pueden llegar a ser de gran interés para la industria alimentaria. Los valores de pH y de color ( $L^*a^*b^*$ ) variaron dependiendo directamente de la concentración de WPI y del tiempo de almacenamiento. Los valores de dureza y gomosidad se modificaron dependiendo del medio líquido y de la concentración de WPI. La utilización del suero lácteo de queso para la formación del gel favoreció la retención de agua, reduciendo significativamente la sinéresis en refrigeración. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una posible reutilización y revalorización del suero lácteo de queso, produciendo geles con un elevado valor biológico utilizando las Altas Presiones Hidrostáticas como tecnología de producción.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Instituto Alpina de Investigación (IAI) los fondos necesarios para realizar el presente trabajo y al IATA (CSIC) por sus instalaciones.

## REFERENCIAS

Baldasso, C., Barros, T. C., Tessaro, I. C. 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1), 381-386.

Ben-Hassan, R. M., & Ghaly, A. E. 1994. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 47(1), 89-105.

Bodart, M., De Peñaranda, R., Deneyer, A., Flamant, G. 2008. Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment* 43(12), 2046-2058.

Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B., Clark, D. S. 2002. Pressure effects on intra-and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1595(1), 235-249.

Božanić R, Barukčić I, Jakopović KL and Tratnik L. 2014. Possibilities of Whey Utilisation. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2(7), 1-7.

Cheftel, J. C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, & P. Masson (Eds.), *High pressure and biotechnology*, Vol. 224 (pp. 195–209). Montrouge: Colloque INSERM/John Libbey Eurotex Ltd.

Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H., & Creamer, L. K. 2007. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 1-23.

Considine, T., Patel, H. A., Singh, H., & Creamer, L. K. 2005. Influence of binding of sodium dodecyl sulfate, all-trans-retinol, palmitate, and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate on the heat-induced unfolding and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin B. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 3197-3205.



- Devi, A. F., Liu, L. H., Hemar, Y., Buckow, R., & Kasapis, S. 2013. Effect of high pressure processing on rheological and structural properties of milk–gelatin mixtures. *Food chemistry*, 141(2), 1328-1334.
- Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* 28(3), 375-384.
- Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. 2004. High pressure treatment of bovine milk: Effects of casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research* 71, 97-106.
- Kanno, C., Mu, T. H., Hagiwara, T., Ametani, M., Azuma, N. 1998. Gel formation from industrial milk whey proteins under hydrostatic pressure: effect of hydrostatic pressure and protein concentration. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(2), 417-424.
- Kosikowski, F.V. 1979. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science* 62, 1149-1160
- López-Fandiño, R. 2006. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal* 16, 1119-1131.
- Lucey, J.A. Milk Protein Gels. Boland, M., Singh, H., & Thompson, A. (Eds.). (2014). *Milk proteins: from expression to food*. Academic Press. Chapter 17 pp 493-523.
- Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L., & Fiszman, S. M. (2011). Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 729-736.
- McGuffey, M.K., Epting, K.L., Kelly, R.M., Foegeding, E.A. 2005. Denaturation and aggregation of three  $\alpha$ -lactalbumin preparations at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3182-3190.
- Michel, M., Leser, M.E., Syrbe, A., Clerc, M.-F., Bauwens, I., Bovetto, L., von Schack, M.-L., Watzke, H.J., 2001. Pressure effects on whey protein-pectin mixtures. *Lebensmittel- issenschaft und -Technologie* 34, 41–52.
- Oakenfull, D., Pearce, J., Burley, R.W. Protein gelation. Damodaran, S., Paraf, A. (Eds.), *Food Proteins and their Applications*, Marcel Dekker, New York (1997), pp. 111–142.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. 2012. *Agricultural Outlook 2012-2021*. (accessed July 2, 2015).

- Olsen, K., Ipsen, R., Otte, J., Skibsted, L.H. 1999. Effect of high pressure on aggregation and thermal gelation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Milchwissenschaft*, 54, 543-545.
- Patel, H.A., Huppertz, T. Milk Protein Gels. Boland, M., Singh, H., & Thompson, A. (Eds.). (2014). *Milk proteins: from expression to food*. Academic Press. Chapter 17 pp 243–267.
- Patel, H.A., Singh, H., Havea, P., Considine, T., Creamer, L.K. 2005. Pressure-induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9590-9601.
- Ribotta, P. D., & Rosell, C. M. 2010. Effects of enzymatic modification of soybean protein on the pasting and rheological profile of starch–protein systems. *Starch-Stärke* 62(7), 373-383.
- Ribotta, P. D., Colombo, A., & Rosell, C. M. 2012. Enzymatic modifications of pea protein and its application in protein–cassava and corn starch gels. *Food Hydrocolloids* 27(1), 185-190.
- Ribotta, P. D., Colombo, A., León, A. E., & Añón, M. C. 2007. Effects of soy protein on physical and rheological properties of wheat starch. *Starch-Stärke* 59(12), 614-623.
- Saddoud, A.; Hassaïri, I.; Sayadi, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol.* 2007, 98, 2102-2108.
- Siso, M. G. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57(1), 1-11.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal* 18(7), 695-704.
- Stapelfeldt, H., Skibsted, L.H. 1999. Pressure denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin studied by intrinsic fluorescence depolarization, Rayleigh scattering, radiationless energy transfer and hydrophobic fluoroprobing. *Journal of Dairy Research* 66, 545-558.
- Tanaka, N., Kunugi, S. 1996. Effect of pressure on the deuterium exchange reaction of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules* 18, 33–39.
- Tanaka, N., Tsurui, Y., Kobayashi, I., Kunugi, S. 1996. Modification of the single unpaired sulfhydryl group of  $\beta$ -lactoglobulin under high pressure and the role of intermolecular S-

S exchange in the pressure denaturation [single SH of b-lactoglobulin and pressure denaturation]. *International Journal of Biological Macromolecules* 19, 63-68.

Torres, E. F., González-M, G., Klotz, B., & Rodrigo, D. (2015). Effects of high hydrostatic pressure and temperature increase on *Escherichia coli* spp. and pectin methyl esterase inactivation in orange juice. *Food Science and Technology International*, doi: 1082013215582107.

Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 589-601.

Yang, J., Dunker, A.K., Powers, J.R., Clark, S., Swanson, B.G. 2001.  $\beta$ -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3236-3243.

Zheng, G. H., Sosulski, F. W. 1998. Determination of water separation from cooked starch and flour pastes after refrigeration and freeze-thaw. *Journal of Food Science* 63, 134-139.



# **CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO I

Las Altas Presiones Hidrostáticas en torno a los 350 - 400 MPa y temperaturas iniciales moderadas de 20 °C son efectivos para controlar la presencia de mohos y levaduras alteradores del queso fresco como *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum*.

No se observan diferencias significativas en cuanto a los niveles de inactivación alcanzados por HHP para cada una de las concentraciones estudiadas de NaCl para todos los tratamientos (Presión-tiempo), por tanto se puede concluir, que en nuestro estudio, la concentración de cloruro sódico presente en el medio de referencia agua de peptona no puede considerarse como un factor adicional de control para *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum* tratadas por HHP.

Los niveles de inactivación obtenidos bajo cada tratamiento dependieron directamente del microorganismo estudiado, ya que las células de *R. glutinis* presentaron un menor resistencia a las HHP, en comparación con las esporas de *P. aurantiogriseum*.

Se observaron diferencias significativas entre los valores de  $b$  en el medio de referencia y el queso fresco, obteniéndose una mayor reducción de la carga inicial en el medio de referencia para unas mismas condiciones de trabajo.

El presente estudio contribuye al estado del conocimiento en cuanto al futuro procesado por HHP de productos sensibles a procesos térmicos típicos de pasteurización, en cuanto a preservar la calidad del producto tratado y prolongar su vida útil.

## CAPÍTULO II

Las bacterias inoculadas en medios con elevados porcentajes de NaCl fueron más resistentes a los tratamientos por HHP. El efecto baroprotector en contraste con otros estudios publicados se produjo a concentraciones de NaCl inferiores al 15% (0,5 y 0,8%) de NaCl.

Los dos modelos matemáticos utilizados en el estudio, Weibull y Geeraerd pueden interpretar correctamente los datos experimentales de inactivación para *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* bajo las diversas concentraciones de NaCl. Sin embargo el modelo de Weibull es más simple y más fácil de incorporar en una hipotética evaluación de la exposición.

## CAPÍTULO III

Las Altas Presiones Hidrostáticas reducen la carga microbiana de bacterias patógenas y alteradoras en queso fresco y pone de manifiesto la necesidad de evaluar las características propias de cada matriz a tratar, con la finalidad de obtener resultados óptimos de inactivación microbiana especialmente para tratamientos inferiores a 400 MPa.

Los microorganismos inoculados (*L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*) en medios complejos (queso fresco) fueron menos resistentes a los tratamientos por HHP que aquellos tratados en un medio simple (agua peptona 0.5% NaCl), mientras que para *S. aureus* la matriz compleja supuso una barrera protectora frente a las

HHP.

El modelo de Weibull puede interpretar correctamente los datos experimentales de inactivación para *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* inoculado en diversas matrices tanto simples como complejas.

El tratamiento por Alta Presión Hidrostática modifica algunos parámetros fisicoquímicos y de textura en el queso fresco. Produciéndose modificaciones en el pH, aumento de los colores amarillo y verde y de los valores de adhesividad, cohesividad y gomosidad, sin embargo se produjo una disminución significativa del color blanco, dureza, masticabilidad y recuperación. Igualmente se recomienda que para futuros estudios se profundice en los cambios sensoriales, ya que los tratamientos de HHP generan diversos cambios que pueden ser de interés industrial.

#### **CAPÍTULO IV**

Las soluciones de suero lácteo con adición de WPI procesadas bajo HHP dieron lugar a geles con características fisicoquímicas que pueden llegar a ser de gran interés para la industria alimentaria.

Los valores de pH y de color ( $L^*a^*b^*$ ) variaron dependiendo directamente de la concentración de WPI y del tiempo de almacenamiento.

Los valores de dureza y gomosidad se modificaron dependiendo del medio líquido y de la concentración de WPI.

La utilización del suero lácteo de queso para la formación del gel favoreció la retención de agua, reduciendo significativamente la sinéresis en refrigeración.



Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una posible reutilización y revalorización del suero lácteo de queso, produciendo geles con un elevado valor biológico utilizando las Altas Presiones Hidrostáticas como tecnología de producción.

## CHAPTER I

The high hydrostatic pressures around 350-400 MPa and moderate initial temperatures of 20 °C are effective in controlling the presence of molds and yeasts altering fresh cheese as *R. glutinis* and *P. aurantiogriseum*.

No significant differences in levels of inactivation achieved by HHP are observed for each of the studied concentrations of NaCl for all the treatments (Pressure-time), therefore it can be concluded, that in our study, the sodium chloride concentration present in the reference medium, peptone water can't be regarded as an additional control factor for *R. glutinis* and *P. aurantiogriseum* treated by HHP.

The inactivation levels obtained under each treatment depended directly on the studied microorganism, as *R. glutinis* cells had a lower resistance to the HHP compared to spores of *P. aurantiogriseum*.

Significant differences between the b values in the reference medium and the fresh cheese were observed, obtaining a greater reduction of the initial charge in the reference medium for the same work conditions.

This study contributes to the future state of knowledge regarding by HHP of sensitive products processed by typical thermal pasteurization processes, to preserve the quality of the treated product and prolong its useful life.

## CHAPTER II

The microorganism inoculated in a media with high percentages of NaCl were more resistant to the treatment by HHP. The baroprotector effect in contrast with

other published studies, occurred at NaCl concentrations below 15% (0.5 and 0.8%) NaCl.

The two mathematical models used in the study, Weibull and Geeraerd can correctly explain the experimental inactivation data for *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* under the different concentrations of NaCl. However the Weibull model is simpler and easier to incorporate in a hypothetical exposure assessment.

### **CHAPTER III**

The high hydrostatic pressures reduce the microbial load of pathogenic microorganism and disrupting in fresh cheese and show how important is to evaluate each matrix characteristics, in order to obtain optimum results of microbial inactivation, especially for lower treatment at 400 MPa.

The inoculated microorganisms (*L. monocytogenes*, *Ps. Fluorescens*) in complex media (fresh cheese) were less resistant to the treatment by HHP than those treated in a simple medium (peptone water 0.5% NaCl), while for *S. aureus* the complex matrix assumed a protective barrier against HHP.

The Weibull model can correctly interpret the inactivation experimental data for *L. monocytogenes*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus* inoculated in both, simple or complex matrix.

The High Hydrostatic Pressure treatment modifies some texture and physicochemical parameters in the fresh cheese. Occurring some pH changes, increase the yellow and green colors and the adhesiveness values, cohesiveness

and gumminess, however there was a significant decrease of the white color, hardness, chewiness and recovery. It is also recommended that for future studies it is important go deeper into the sensory changes, as the HHP treatments generate various changes that may be of industrial interest.

#### **CHAPTER IV**

The whey cheese solutions with WPI addition processed under HHP, resulted in gels with physicochemical characteristics that can become of great interest to the food industry.

The pH and color (L \* a \* b \*) values varied depending directly in the WPI concentration and shelf life period.

The hardness and gumminess values were modified depending on the liquid medium and the WPI concentration.

The use of the whey cheese in the gel formation bring on water retention, significantly reducing the syneresis under refrigeration.

The results obtained in this study show a possible reuse and enhancement of the whey cheese, producing gels with a high biological value using the high hydrostatic pressures as production technology.

# **ANEXOS**

Review

## High Pressure Treatment in Foods

Edwin Fabian Torres Bello <sup>1,\*</sup>, Gerardo González Martínez <sup>2</sup>, Bernadette F. Klotz Ceberio <sup>2</sup>, Dolores Rodrigo <sup>1</sup> and Antonio Martínez López <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Agrochemistry and Food Technology (CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico, 46980 Paterna (Valencia), Spain; E-Mails: lolesra@iata.csic.es (D.R.); amartinez@iata.csic.es (A.M.L.)

<sup>2</sup> Alpina Research Institute (IAI), Alpina Productos Alimenticios S.A, Edificio Corporativo Km 3 vía, Briceño-Sopó, Cundinamarca, 251001, Colombia; E-Mails: gerardo.gonzalez@alpina.com.co (G.G.M.); bernadette.klotz@alpina.com (B.F.K.C.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fabiantb@iata.csic.es; Tel.: +34-963-900-022 (ext. 2217).

Received: 8 May 2014; in revised form: 9 July 2014 / Accepted: 14 July 2014 /

Published: 19 August 2014

---

**Abstract:** High hydrostatic pressure (HHP), a non-thermal technology, which typically uses water as a pressure transfer medium, is characterized by a minimal impact on food characteristics (sensory, nutritional, and functional). Today, this technology, present in many food companies, can effectively inactivate bacterial cells and many enzymes. All this makes HHP very attractive, with very good acceptance by consumers, who value the organoleptic characteristics of products processed by this non-thermal food preservation technology because they associate these products with fresh-like. On the other hand, this technology reduces the need for non-natural synthetic additives of low consumer acceptance.

**Keywords:** high pressure; microorganism; spores; protein; enzyme; packaging; cheese

---

### 1. Introduction

Currently consumers worldwide are more demanding with regard to the quality and safety of the foods they consume, especially those that produce the perception of healthy products. To meet these demands, the food industry has improved its heat preservation processes by developing continuous high temperature/short time (HTST) and ultra high temperature (UHT) treatments and aseptic

## Preservation of Foods

EF Torres, D Rodrigo, and A Martínez, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Valencia, Spain

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Foods are perishable commodities containing enough nutrients and water to be altered by microorganisms or support deteriorative enzymatic reactions. This explains the need for and development of preservation processes. Agents that can spoil or alter foods can be divided into physical, chemical, and biological agents.

- Physical agents: Mechanical processes, temperature, dryness, and light
- Chemical agents: The Maillard reaction, lipid rancidity, and oxidation of vitamins, among others
- Biological agents: Enzymes, parasites, and microorganisms in general

Among the agents mentioned earlier, microorganisms (spoilage and pathogens) have been the prime targets of preservation processes because of the serious consequences that their presence has on human health.

Various preservation methods have been used in human history, many of them taking advantage of natural circumstances, and they have been consolidated and improved. The most common food preservation methods include salting, curing, smoking, marinating, freezing, refrigeration, drying, and heat treatment. There are now new emerging technologies that were developed toward the end of the twentieth century, being the most important high hydrostatic pressure (HHP), irradiation, and pulsed electric fields (PEF).

In this contribution, a review about concepts related to food preservation is addressed, and a brief description of some of the most important traditional and new emerging technologies is given.

### Food Preservation

What does food preservation mean? Although the concept of preservation is very broad, it can be said that it consists in performing actions to maintain the desired natural properties of foods as long as possible, protecting them from pathogens and other agents responsible for spoilage, thus allowing later consumption. These actions lie squarely in the heart of food science and technology, and they are the primary purpose of food processing.

The processing and storage of food are vital for a continuous supply of nourishment during growing or production seasons and afterward. The main reasons for food processing and preservation are the following:

- To absorb agricultural surplus and reduce losses generated as a result of the highly perishable nature of foodstuffs
- To provide products with added value (vegetables and fruits, meats, eggs, and milk, among others)

- To provide variations in the diet and, in the case of fruit and vegetables, to make them available outside the growing season

Food preservation goes back to very remote times. In ancient times, salt, ice, and cold air were used to preserve food. In ancient Egypt, liquids such as oil, vinegar derivatives, and even honey were used to increase the life of foodstuffs; and salting and smoking were also part of their preservation techniques. In Persia, sugar was added to certain foods, and in Greece, the fruit and vegetable were also coated with sugar. In Gaul, the druids put fruit in baskets covered with leaves to keep them fresh longer, probably as a result of the action of CO<sub>2</sub> evolving from the respiration of the fruit, while in Rome, wine was preserved by adding sulfur dioxide. Between the fifteenth and the eighteenth centuries, sauces and borax were used, but it was in the nineteenth century that all the preservation technology began to develop, with the application of sulfite to meat; the use of organic acids such as boric, salicylic, and benzoic acid; and a great development the appertization invented by Nicolas Appert in 1810. Appertization was the first direct attempt by man to intentionally create a new method for preserving food. Progress was also made in the effective recognition of microorganisms as the main source of alteration of food with the discovery of bacterial spores. Appertization was the beginning of a huge industry based on the use of heat to preserve food. Canning soon became established throughout the world, although it was not until 80 years later that science started to apply it to the development of preservation procedures and their control. Until the mid-twentieth century, the main form of preservation was heat treatment, although salting, drying, fermentation, cold smoking, and other preservation methods were also used. Subsequently, other methods were developed, such as freezing, the use of modified atmospheres, aseptic food packaging, and high-temperature short-time (HTST) or ultrahigh-temperature short-time (UHT) treatments, as well as a variety of innovative technologies not based on heat, such as high hydrostatic pressure, irradiation, electrical pulses, and light pulses. Chemical preservatives and, more recently, natural antimicrobials (essential oils, polyphenols, etc.) appeared and have been used as preservatives for a long time by the food industry.

### Biological Food Spoilage

Many of the microorganisms that alter food are pathogenic to humans and animals, and it is necessary to remove them or control their development throughout the food's shelf life. Microorganisms can reach food in various ways, basically before, during, and after processing.



The technology of High Hydrostatic Pressure (HHP) is the nonthermal food technology that has been most developed commercially. It has achieved microbial and enzymatic inactivation levels close to thermal pasteurization ones, preserving sensory and nutritional properties of the processed products. To achieve this level of inactivation, a pressure level in the range of [100–800] MPa (megapascals) is used with short treatment times (ranging from a few seconds to several minutes), combined with moderate temperature (20–50 °C). In the present book, the yeast *Rhodotorula glutinis* and the mold *Penicillium aurantiogriseum*, spoilage microorganisms responsible for altering the quality of fresh cheese and reducing its shelf life, were treated by HHP at pressure levels of 200, 300, 350, and 400 MPa, with treatment times ranging from 1 to 15 min. The experimental results were fitted to a non-linear model, the Weibull distribution function.



Edwin Fabian Torres Bello  
Gerardo González Martínez  
Antonio Martínez López

## Effect of sodium chloride on microbial inactivation by high pressure

Inactivation by high hydrostatic pressure (HHP) of *R. glutinis* and *P. aurantiogriseum* in peptone medium and fresh cheese

Edwin Fabian Torres has a bachelor's degree in Industrial Microbiology and master's degree in Food Science and Engineering from the UPV Spain. At present he is studying for a PhD in Science, Technology and Food Management at the Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC) he has been researching non-thermal technologies HHP and PEF.



978-3-659-68483-8

