

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
UNITAT DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS

APLICACION DE LA ALTA PRESION
HIDROSTATICA EN *MATÓ*
(QUESO FRESCO DE LECHE DE CABRA)

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA Y
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

MARTA CAPELLAS PUIG

Bellaterra, 1998



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
UNITAT DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS

APLICACION DE LA ALTA PRESION
HIDROSTATICA EN *MATÓ*
(QUESO FRESCO DE LECHE DE CABRA)

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA Y
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

MARTA CAPELLAS PUIG

Bellaterra, 1998

BUENAVENTURA GUAMIS LOPEZ, Catedrático de Tecnología de los Alimentos, y
MONTSERRAT MOR-MUR FRANCESCH, Profesora Titular de Tecnología de los
Alimentos de la *Facultat de Veterinària* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*

HACEN CONSTAR: Que la licenciada en Veterinaria Marta Capellas Puig ha
realizado, bajo su dirección, en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la *Facultat
de Veterinària* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, el trabajo titulado:
“Aplicación de la alta presión hidrostática en *Mató* (queso fresco de leche de cabra) que
presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Bellaterra a 22 de Enero de
1998



Buenaventura Guamis López



Montserrat Mor-Mur Francesch

Este trabajo se ha realizado con la financiación aportada por la Unión Europea a través de los proyectos de investigación:
AIR1-CT92-0296
FAIR-CT96-1113.

AGRAÏMENTS.

A la Montserrat Mor-Mur y en Ventura Guamis, pel seu treball en la direcció d'aquesta tesi.

A la *Colección Española de Cultivos Tipo*, pel subministrament de les soques de microorganismes.

A *Grace*, S.A. pel subministrament del material d'envasat.

Al Sr. *Juan Largo*, d'Adimport, per la rapidesa i sol.licitud a l'hora de servir-nos la nisina.

Al Sr. *Antoni Curieses* d' INMASA, pel seu ajut en la posta en marxa de l'equip d'alta pressió.

Al personal del Servei de Microscòpia de la UAB, per familiaritzar-me amb els aparells que tenen al seu càrrec.

Al personal, companys i amics de la Unitat, per compartir amb mi tantes coses bones i dolentes, transcendents i insignificants, comestibles i incomedibles...

A la meua família, per escoltar tantes vegades allò de: "és que tinc feina amb la tesi" amb comprensió i interès.

INDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. APLICACION DE LA ALTA PRESION EN LA CONSERVACION Y TRANSFORMACION DE LOS ALIMENTOS	3
1.1 Definición y situación actual de la tecnología.....	3
1.2 Fundamentos.....	4
1.3 Aplicaciones	6
1.4 Descripción general de un sistema de alta presión.....	8
1.4.1 Recipiente de presurización y cierre.....	9
1.4.2 Sistemas de generación de presión	9
1.4.3 Sistemas de regulación de la temperatura	11
1.5 Características de los equipos industriales	12
1.6 Características del material de envasado.....	12
1.7 Efectos de la presión sobre la contaminación biótica de los alimentos... 12	
1.7.1 Células vegetativas	12
1.7.1.1 Morfología celular.....	13
1.7.1.2 Pared y membrana celulares.....	13
1.7.1.3 Reacciones metabólicas.....	15
1.7.1.4 Mecanismos genéticos.....	16
1.7.2 Factores que afectan a la sensibilidad de las células vegetativas a la alta presión	17
1.7.2.1 Estado fisiológico de las células.....	17
1.7.2.2 Variaciones inter- e intra- especies.....	17
1.7.2.3 Magnitud y duración de la presión	19
1.7.2.4 Temperatura.....	19
1.7.2.5 Medio.....	20
1.7.3 Esporas	21
1.7.4 Virus	24
1.7.5 Parásitos.....	25
1.7.6 Utilización de tratamientos combinados	26
1.8 Efectos de la alta presión sobre los componentes de los alimentos	27
1.8.1 Agua	27
1.8.2 Lípidos.....	29

1.8.3	Proteínas	30
1.8.3.1	Efectos de la presión sobre la función de las proteínas	31
1.8.3.1.1	Enzimas	31
1.8.3.1.2	Efectos sobre la transición sol-gel	32
1.8.3.1.3	Efectos sobre las propiedades funcionales ...	33
1.8.4	Hidratos de carbono.....	33
1.9	Efectos y aplicaciones de la alta presión en leche y queso.....	34
1.9.1	Utilización de la alta presión para reducir la carga microbiana de la leche.....	34
1.9.2	Efecto sobre las proteínas de la leche.....	36
1.9.2.1	Caseínas.....	36
1.9.2.2	Proteínas séricas	38
1.9.2.3	Propiedades funcionales	40
1.9.2.4	Enzimas	41
1.9.3	Efecto sobre los restantes componentes de la leche	41
1.9.4	Aplicación de la alta presión en quesos.....	42
2.	EL QUESO <i>MATÓ</i>	44
2.1	Proceso de elaboración.....	44
2.2	Conservación del <i>Mató</i>	46
3.	LA NISINA. UTILIZACION DE NISINA COMO CONSERVANTE	47
II.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	51
1.	OBJETIVOS.....	53
2.	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	54
2.1	<i>Escherichia coli</i>	54
2.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	55
2.3	Esporas de <i>Bacillus subtilis</i>	58
2.4	Experiencias en quesos con nisina y no inoculados	58
3.	ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS	59
3.1	Experiencias preliminares para valorar el desuerado	59

3.2 Experiencias para el análisis de las características físico-químicas	59
III. MATERIALES Y METODOS	63
1. Elaboración del <i>Mató</i>	65
1.1 Quesos utilizados en las experiencias con microorganismos	65
1.2 Preparación de los inóculos	66
1.3 Quesos utilizados en el análisis de los aspectos físico-químicas	66
2. Tratamientos de alta presión.....	66
3. Análisis microbiológicos	67
3.1 Preparación de la muestra.....	67
3.2 Recuento de bacterias aerobias mesófilas (BAM).....	67
3.3 <i>Escherichia coli</i>	67
3.4 <i>Staphylococcus carnosus</i>	68
3.5 Recuento de esporas	68
3.6 Expresión de los resultados	68
4. Contenido en nisina	68
5. Análisis de composición de leche, queso y suero.....	69
6. Determinación del pH.....	70
7. Análisis de las variaciones en el desuerado.....	70
7.1 Análisis preliminares	70
7.2 Método de gravedad	70
7.3 Método de centrifugación.....	71
8. Análisis instrumental de la textura	71
9. Análisis instrumental del color.....	72
10. Análisis sensorial.....	73
11. Estudio de la microestructura	74
11.1 Microscopía laser confocal (MLC)	74
11.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	75
12. Análisis estadístico	75
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	77
1. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	79
1.1 <i>Escherichia coli</i>	79
1.2 <i>Staphylococcus carnosus</i>	87

1.3 Esporas de <i>Bacillus subtilis</i>	100
1.4 Experiencias en quesos con nisina y no inoculados	102
2. ASPECTOS FISICO-QUIMICOS	107
2.1 Composición de la leche y los quesos	107
2.2 Efecto de la alta presión sobre la composición del <i>Mató</i>	109
2.3 Efecto sobre el desuerado	121
2.3.1 Experiencias preliminares	121
2.3.2 Análisis por centrifugación y gravedad.....	123
2.4 Efecto sobre la textura	126
2.5 Efecto sobre el color	132
2.6 Análisis sensorial.....	136
2.7 Efecto sobre la microestructura.....	140
2.7.1 Microscopía laser confocal (MLC)	140
2.7.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	143
V. CONCLUSIONES	161
VI. BIBLIOGRAFIA.....	167

ABREVIATURAS

BAM: bacterias aerobias mesófilas

BP: medio Baird-Parker

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CEN: contenido en cenizas

EST: contenido en materia seca

L: letalidad

LC: leche cruda

LI: leche inoculada

LP: leche pasteurizada

NT: nitrógeno total

MEB: microscopía electrónica de barrido

MG: contenido en materia grasa

MLC: microscopía láser confocal

MPa: megapascal

NMP: número más probable

NNP: nitrógeno no proteico

NS: nitrógeno soluble

PCA: agar de recuento en placa

P1: producción 1, tratamientos a 500 MPa/10°C/5, 15 y 30 min

P2: producción 2, tratamientos a 500 MPa/10°C/5, 15 y 30 min

P3: producción 3, tratamientos a 500 MPa/25°C/5, 15 y 30 min

P4: producción 4, tratamientos a 500 MPa/25°C/5, 15 y 30 min

P5: producción 5, tratamientos a 500 MPa/25°C/5, 15 y 30 min en ciclos de 5 min

P6: producción 6, tratamientos a 500 MPa/25°C/5, 15 y 30 min en ciclos de 5 min

QC: queso elaborado con leche sin inocular o queso control

QCP: queso control presurizado

QLI : queso elaborado con leche inoculada

QLIP: queso elaborado con leche inoculada presurizado

UFC: unidades formadoras de colonias

VRBA: agar rojo violeta bilis

I. INTRODUCCION.

1. APLICACION DE LA ALTA PRESION EN LA CONSERVACION Y TRANSFORMACION DE LOS ALIMENTOS

1.1 Definición y situación actual de la tecnología.

Se entiende por alta presión la tecnología que utiliza presiones de trabajo comprendidas entre 100 y 1000 MPa.

Esta tecnología es ampliamente conocida en el campo de la ciencia de los materiales inorgánicos, donde se combinan presiones a partir de 100 MPa con temperaturas del orden de los 1000°C para la producción de cerámicas, aleaciones de metales y la creación de materiales sintéticos (Hoover y col., 1989). Su aplicación en el procesado de alimentos ha adquirido especial importancia en las dos últimas décadas, si bien su utilidad en este campo ya fue señalada por el equipo de investigadores de Bert H. Hite, a partir de los estudios iniciados en 1897 sobre los efectos de presiones de hasta 1000 MPa en la conservación de leche, carne y zumos de frutas (Johnston, 1995). Durante mucho tiempo, los problemas tecnológicos derivados de la manipulación a tan elevadas presiones supusieron un freno para el desarrollo de la técnica, pero una vez superadas las dificultades gracias a los avances realizados en la industria de materiales y atendiendo a la creciente demanda de productos seguros, sometidos a procesado mínimo y libres de aditivos se ha retomado el interés por la utilización de la alta presión en la conservación y transformación de alimentos.

En la década de los ochenta, la universidad y la industria japonesas, apoyadas por el ministerio de agricultura, fueron pioneras en el desarrollo de la alta presión para su utilización en la industria alimentaria. En 1992 los primeros productos tratados por alta presión salieron al mercado y a finales de 1995 ya eran siete las compañías que comercializaban productos (mermeladas, zumos de fruta, salsas, vino de arroz, pastel de arroz) tratados por esta tecnología (Hayashi, 1997). En 1997 una industria estadounidense inició la comercialización de guacamole (Mermelstein, 1997), y en Francia empezaban a lanzar al mercado zumos de frutas tratados por alta presión (Tonello, 1997). Desde la iniciativa japonesa hasta hoy se ha celebrado un congreso conjunto entre Japón y Europa en Francia (1992), un seminario europeo (1992) y varios congresos internacionales en Japón (1991, 1993, 1995). El trigésimocuarto

congreso del Grupo Europeo de Investigación en Alta Presión (EHPRG), celebrado en Bélgica en 1996, fue casi por entero dedicado a las materias de Biociencia y Biotecnología (Heremans, 1997) y en 1997 tuvo lugar la trigésimoquinta edición en el Reino Unido. La Unión Europea ha financiado tres programas conjuntos de investigación desde 1992, en dos de los cuales hemos participado y han permitido la realización de este trabajo (AIR1-CT92-0296 y FAIR-CT96-1113).

1.2 Fundamentos.

En el presente trabajo utilizaremos el Pascal (Pa), la unidad del SI, y transformaremos las unidades utilizadas en otros estudios para poder establecer comparaciones con más facilidad.

Las unidades de presión utilizadas más frecuentemente son:

$$1 \text{ atm} = 1 \text{ kg f cm}^{-2} = 1,01325 \text{ bar} = 0,101325 \text{ MPa}$$

El comportamiento de los sistemas bioquímicos bajo presión está gobernado por el principio de Le Chatelier, que postula que la aplicación de presión desvía el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupe menor volumen, y acelera aquellos procesos en los que el estado de transición presenta un volumen menor que el estado inicial. Es decir, la presión favorece los procesos que van acompañados de cambios de volumen negativos (Mozhaev y col., 1994).

Para un proceso elemental $A \rightleftharpoons B$, el efecto de la presión sobre su constante de equilibrio (K) está descrito por la siguiente expresión:

$$\Delta V = V_B - V_A = (\Delta G / \delta p)_T = -RT(\delta \ln K / \delta p)_T$$

donde ΔV es la diferencia de volumen entre el estado inicial V_A y el final V_B , ΔG es el cambio en la energía libre del sistema y R la constante de los gases ($0.082 \text{ l atm } ^\circ\text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Así, para un proceso con ΔV negativo, un aumento de la presión (p) es responsable del aumento del valor de la constante de equilibrio (K).

Los efectos de la presión sobre la constante de velocidad (k) del mismo proceso elemental se describen según la teoría del estado de transición (Morild, 1981):

$$\Delta V^\ddagger = V^\ddagger - V_A = (\Delta G^\ddagger / \delta p)_T = -RT(\delta \ln k / \delta p)_T$$

donde ΔV^\ddagger y ΔG^\ddagger son los cambios en el volumen y la energía libre de activación,

respectivamente; V^\ddagger el volumen del estado activado y V_A el volumen del estado inicial. Si el volumen de un sistema en el estado activado es menor que en el estado inicial (valores de ΔV^\ddagger negativos) la velocidad de la reacción se ve favorecida si aumenta la presión.

Los cambios de volumen que acompañan a la formación de la mayoría de las interacciones entre biomoléculas son los siguientes (Mozhaev, 1994):

Enlaces covalentes. ΔV^\ddagger de -10 ml mol^{-1} en la formación de enlaces, y valores de ΔV cercanos a cero en los intercambios entre enlaces covalentes. La estructura covalente no se altera a presiones inferiores a 1000-2000 MPa debido a la baja compresibilidad de los enlaces covalentes.

Interacciones electrostáticas. ΔV de -10 ml mol^{-1} en la hidratación de un grupo cargado, y valores positivos de $10-20 \text{ ml mol}^{-1}$ en la formación de un enlace electrostático. Al solvotarse un grupo cargado se produce el fenómeno conocido como *electrostricción*, en el que el agua se organiza de manera más compacta alrededor de las cargas iónicas y los centros polarizados de los grupos funcionales de las moléculas. Al presentar un ΔV negativo, este fenómeno se ve favorecido por la alta presión. En cambio, la formación de interacciones electrostáticas después de la deshidratación de grupos cargados, representa un ΔV positivo y está en condiciones desfavorables bajo presión.

Interacciones hidrofóbicas. Aumento de volumen de $10-20 \text{ ml mol}^{-1}$ cuando grupos CH_2 se incorporan al contacto hidrofóbico. Las interacciones hidrofóbicas se desestabilizan bajo presión.

Puentes de hidrógeno. Según Mozhaev y col. (1994) y Gross y Jaenicke (1994) los puentes de hidrógeno se forman y se destruyen con ΔV que pueden ser positivos o negativos dependiendo del sistema, pero en cualquier caso, muy cercanos a cero y negligibles. Por lo tanto, son prácticamente insensibles a la presión. En cambio, según Morild (1981), Kunugi (1992), Wong y Armstrong (1992), Tauscher (1995) y Smeller y col. (1995) la formación de puentes de hidrógeno va asociada a

una pequeña contracción de volumen debido a una disminución de la distancia interatómica y los puentes de hidrógeno se ven ligeramente reforzados bajo presión. De todos modos, la formación de puentes de hidrógeno no siempre está asociada a una contracción de volumen pues puede conllevar la creación de estructuras voluminosas abiertas o interacciones hidrofóbicas que compensen o superen la disminución de volumen.

A diferencia de lo que ocurre en el tratamiento térmico, en que los tiempos de calentamiento y enfriamiento son largos y existen pérdidas de energía durante el proceso, los cambios de presión son prácticamente instantáneos y al tratarse de una transmisión isostática son uniformes y, por lo tanto, el proceso es independiente del volumen y la geometría de la muestra (Knorr, 1995). Además, una vez el sistema se halla bajo presión, al no haber pérdidas de energía no existen requerimientos energéticos adicionales (Heremans, 1995).

1.3 Aplicaciones.

El principal atractivo de esta tecnología reside en que, al poder realizar el tratamiento a temperatura ambiente se conservan los parámetros de calidad del producto original (Cheftel, 1992). Inicialmente su principal ventaja residía en que podía utilizarse como un sustituto parcial o total del tratamiento térmico cuando el objetivo era la destrucción microbiana. Por ejemplo, en las aplicaciones a temperaturas por debajo de los 50°C se consigue la inactivación de las células vegetativas microbianas sin alterar el aroma, el sabor o el color de los alimentos (Cheftel, 1995), aunque deberíamos matizar esta afirmación y añadir que, dependiendo del tratamiento empleado y del producto inicial, pueden aparecer cambios en las características organolépticas. Ejemplos de ello serían el endurecimiento de la estructura interior de tomates tratados por alta presión, la tenderización de la carne, la observación en el tejido de filetes de pollo y pescado de una opacidad similar a la que produciría una cocción muy ligera o el hecho que las ostras crudas se aplanan, pero adquieren mejor sabor (Hoover, 1989). En definitiva, la aplicación de la alta presión produce una amplia gama de efectos (positivos y negativos) que pueden manifestarse sobre cualquier característica del alimento.

Inicialmente se propuso que la alta presión afecta menos al valor nutritivo que

el tratamiento térmico. Este es uno de los estudios a realizar dentro del proyecto europeo en el que participamos en la actualidad. Bognar y col. (1993) confirmaron que no disminuía el contenido en tiamina de soluciones modelo o carne de cerdo tratadas a 600 MPa/20°C/1-18 h. Kübel y col. (1997) están estudiando la cinética de degradación del acetato de vitamina A en condiciones de presión y temperatura elevadas (el contenido original se reduce a la mitad después de un tratamiento a 650 MPa/70°C/15 min) y la formación de compuestos resultantes, que hasta el momento no han sido identificados. También se está estudiando la cinética de degradación de la vitamina C (Taoukis y col., 1997).

Cabe comentar también el efecto de la alta presión sobre la actividad anticarcinogénica de frutas y vegetales. Butz y col. (1997) han sometido distintas frutas y vegetales a tratamientos térmicos y de alta presión y han identificado tres grupos de productos después de valorar su potencial antimutagénico: uno cuyo potencial antimutagénico es resistente al calor y a la presión, otro con el potencial antimutagénico más o menos sensible al calor pero no a la presión, y un tercero en que el potencial antimutagénico se afecta a combinaciones extremas (600 MPa/50°C/10 min o 800 MPa/35°C/10 min). Se ha estudiado también el efecto sobre los isotiocianatos presentes en el brócoli, compuestos que inducen enzimas anticarcinogénicos y que además juegan un papel importante en la calidad sensorial de algunos vegetales. Grupe y col. (1997) han observado que la alta presión aumenta el grado de degradación de los extractos de isotiocianato hasta 4 veces, además de un cambio muy apreciable en el olor del medio de reacción.

Las aplicaciones de la alta presión van más allá de la inactivación de microorganismos, dependiendo de las combinaciones de presión, temperatura y tiempo que se utilicen. Paralelamente al objetivo de reducir la carga microbiana inicial, las materias primas también pueden ser tratadas con el fin de conservar o mejorar su funcionalidad para la posterior elaboración de derivados: el tratamiento de arroz para la producción de sake aumenta su susceptibilidad a la acción de la amilasa (Miyama y col., 1992) y se mejoran las propiedades emulsificantes de soluciones de proteínas (Denda y Hayashi, 1992). Asimismo, el efecto de la alta presión sobre las propiedades físicas de los alimentos puede conducir a la obtención de nuevos productos (Yoshioka y col., 1992). Por ejemplo, se consigue la gelificación a

temperatura ambiente de distintas soluciones o dispersiones de proteínas alimentarias (miosina, soja, surimi, yema y clara de huevo, proteínas séricas) y se observa que los geles obtenidos por alta presión suelen presentar características distintas a los obtenidos por temperatura. También se ha observado que su aplicación contribuye a la tenderización de la carne (Suzuki y col., 1993).

Las aplicaciones de la alta presión no quedan limitadas a la zona de temperaturas moderadas o bajas, ya que se han propuesto tratamientos combinados a temperaturas entre 60 y 80°C para la destrucción de esporas, que, como veremos más adelante, presentan una elevada resistencia a la alta presión. A temperaturas de congelación son varias las aplicaciones sugeridas: Kumeno y col. (1993) han desarrollado un método para concentrar por congelación y alta presión con núcleos bacterianos, y Deuchi y Hayashi (1992) proponen la congelación ultrarrápida durante la descompresión, así como la descongelación y la conservación a temperaturas de congelación bajo presión.

En alimentos vegetales, además de la conservación de zumos de fruta y mermeladas, se ha estudiado la utilización de las altas presiones para el escaldado. Eshtiaghi y Knorr (1993) han propuesto un tratamiento basado en la alta presión para mejorar la calidad de los productos y reducir las pérdidas de nutrientes y la contaminación ambiental. Han comprobado que el tratamiento tiene poco efecto sobre la textura final del producto en zanahorias, patatas y judías verdes, siendo los escaldados por alta presión los que más se acercan a la textura del producto original.

Estos son solamente algunos ejemplos de las aplicaciones que se derivan de la alta presión. Los ampliaremos a continuación, al tratar con más detalle los efectos sobre la contaminación biótica y los componentes de los alimentos.

1.4 Descripción general de un sistema de alta presión.

Un sistema de alta presión consta esencialmente de un recipiente donde se realiza el tratamiento de presurización, de un sistema de generación de presión, de un sistema de regulación de temperatura y del medio transmisor de presión.

1.4.1 Recipiente de presurización y cierre.

Se trata de un recipiente forjado cilíndrico y monolítico cuyo grosor de pared viene determinado por la presión de trabajo máxima, el diámetro y el número de ciclos para los que ha sido diseñado (Mertens, 1995). Estos cilindros trabajan a presiones máximas de 400-600 MPa. En el caso que sean necesarias presiones más elevadas se utilizan recintos multicapa, cuya complejidad de fabricación, y por tanto, su coste, son mayores.

Los sistemas de cierre se diseñan dependiendo de la aplicación: en el caso de aplicaciones con alimentos se utilizan los sistemas interrumpidos con rosca, de apertura y cierre rápidos, ideales cuando interesa aumentar la productividad del equipo, mientras que los sistemas de cierre continuo, más lentos y económicos, se utilizan en aplicaciones donde los tiempos de apertura y cierre son de poca importancia comparados con la duración total del ciclo. Otra alternativa la presenta el cierre por tambor, que se coloca sobre el recinto antes de iniciarse el tratamiento. Este tipo de cierre requiere más espacio y es más lento y caro que los cierres de rosca y sólo se utiliza cuando no pueden alcanzarse los diámetros apropiados con los cierres de rosca.

1.4.2 Sistemas de generación de presión.

Sistemas indirectos. En los sistemas indirectos el recinto de presurización se llena con un medio transmisor de presión que puede ser aceite o agua mezclada con una pequeña cantidad de aceite lubricante. El aire del recinto se expulsa mediante una bomba de baja presión en combinación con una válvula automática de purga. Una bomba de alta presión impulsa el fluido transmisor de ésta desde un depósito hacia el interior del recipiente de presurización hasta alcanzar la presión deseada (Mertens, 1995).

Los sistemas indirectos pueden ser discontinuos (Figura I.1) o semicontinuos. En los sistemas discontinuos el alimento se encuentra envasado en un contenedor flexible y hermético, sin aire, sumergido en el medio transmisor de presión. En los sistemas semicontinuos, en que los alimentos fluidos se procesan a granel, el medio transmisor de presión impulsa un pistón que se mueve a lo largo del recinto y que a su vez comprime el producto que deseamos presurizar. Este tratamiento debe ir seguido

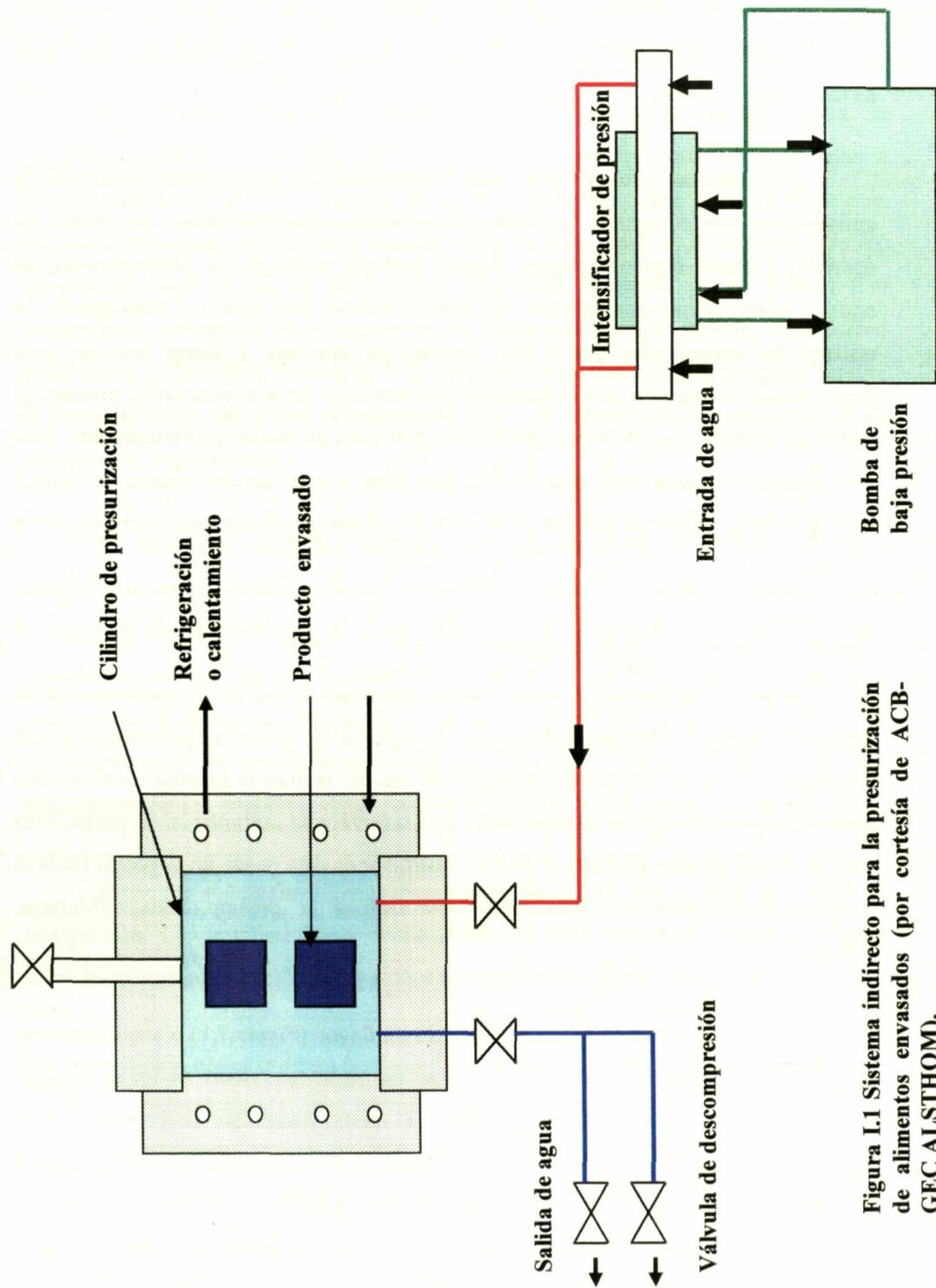


Figura I.1 Sistema indirecto para la presurización de alimentos envasados (por cortesía de ACB-GEC ALSTHOM).

de un envasado aséptico.

Sistemas directos. En los sistemas directos el intensificador de presión se halla en el mismo recinto de presurización. Se trata de una bomba de baja presión que impulsa un pistón por su extremo de mayor diámetro. La presión aumenta debido a la diferencia de diámetro entre las dos secciones del pistón, según el principio hidráulico, lo que provoca la alta presión deseada en el extremo de menor diámetro.

El método permite una compresión muy rápida pero está restringido en la práctica a equipos de laboratorio o piloto de pequeño diámetro, debido a la sensibilidad al desgaste que presenta el cierre dinámico de alta presión entre el pistón y la superficie interna del cilindro (Deplace, 1995).

1.4.3 Sistemas de regulación de temperatura.

La compresión del agua conduce a un aumento de temperatura (2-3°C por cada 100 MPa) que depende de la temperatura inicial del agua y de la velocidad de compresión. Este cambio es reversible al realizarse la descompresión (Cheftel, 1995) ya que causa un descenso en la temperatura del mismo orden de magnitud. Como hemos visto antes, existen aplicaciones de la alta presión que requieren temperaturas distintas a la ambiente, por lo que es necesario incorporar a los equipos sistemas de regulación de la misma.

Sistemas externos. Calientan o enfrían el recinto por la parte exterior. El cilindro está revestido con una camisa por la que puede circular tanto el medio de refrigeración como el de calentamiento, o bien pueden instalarse resistencias eléctricas a su alrededor. La velocidad de calentamiento y enfriamiento es muy baja, y sólo se utiliza este sistema cuando se quiere mantener una temperatura constante en el cilindro y no se requieren ciclos ni cambios térmicos rápidos.

Sistemas internos. Se hace circular el medio de calentamiento o de refrigeración a través del cierre superior o inferior del cilindro, de manera que éstos se transforman en intercambiadores de calor internos. Otra opción es el uso de un intercambiador de calor cilíndrico que se introduce dentro del recinto. También se puede calentar o refrigerar el medio de presurización y hacerlo circular rápidamente al

interior del cilindro, antes y durante el tratamiento. En todos los casos, los sistemas internos resultan más rápidos, sofisticados y caros que los externos (Mertens, 1995).

1.5 Características de los equipos industriales.

Las aplicaciones comerciales más interesantes para la industria de alimentos se han alcanzado combinando presiones entre 400-600 MPa con temperaturas entre 5 y 90°C durante 10-30 min (Mertens, 1995). Los equipos industriales utilizados actualmente son sistemas discontinuos de entre 10 y 500 l de capacidad para el tratamiento de productos envasados y sistemas semicontinuos de 1 a 4 t/hora de capacidad para el tratamiento de líquidos (Hayashi, 1997).

1.6 Características del material de envasado.

Cuando se realizan tratamientos por el sistema indirecto, los envases que se someten a altas presiones deben ser flexibles y permitir sellados herméticos. Los envases plásticos monocapa o multicapa utilizados habitualmente en la industria alimentaria que han sido sometidos a presiones entre 400 y 600 MPa no ven modificadas sus propiedades mecánicas ni de barrera y tampoco se altera la integridad del sellado (Mertens, 1993).

El Moueffak y col. (1997) han estudiado el efecto de 550 MPa/55-85°C/20min sobre distintos envases co-extrusionados y laminados de distintas composiciones. Los envases co-extrusionados son los más adecuados para este tipo de tratamiento puesto que no se altera su permeabilidad al oxígeno ni el sellado. En lo que respecta a los envases laminados, el que contiene aluminio pierde la integridad del sellado y el envase multicapa polietileno/poliamida/polietileno (PE/PA/PE) presenta un aumento de su permeabilidad al oxígeno cercano al 60%. Los autores de este trabajo señalan la importancia de estudiar el efecto de la presión sobre la migración de componentes del material de envasado.

1.7 Efectos de la alta presión sobre la contaminación biótica de los alimentos.

1.7.1 Células vegetativas.

La resistencia de los microorganismos a la presión es muy variable. Según Cheftel (1995) las bacterias gram positivas son más resistentes que las gram negativas. Los hongos y las levaduras son muy sensibles, mientras que las esporas

bacterianas son muy resistentes y pueden sobrevivir a presiones de 1000 MPa.

La alta presión induce cambios en la morfología, en las reacciones bioquímicas, en los mecanismos genéticos y en la pared y membrana celulares de los microorganismos (Hoover, 1989).

1.7.1.1 Morfología celular.

Se ha observado la elongación de células de *Escherichia coli* sometidas a 40 MPa, pasando de una longitud normal de 1-2 μm a 10-100 μm (Zobell y Cobet, 1962). Kriss, en 1969 observó las modificaciones que se producen en células de *Pseudomonas* sometidas a presiones entre 30 y 45 MPa: alargamiento de células, separación entre la pared celular y la membrana citoplasmática, aclaramiento de zonas en las estructuras reticulares del citoplasma y disminución en el número de ribosomas (Knorr, 1995). Osumi y col. (1992) observan daños en la pared celular y las crestas mitocondriales y la aparición de poros en la membrana del núcleo al someter las células de la levadura *Candida tropicalis* a presiones superiores a 200 MPa. Shimada y col. (1993) observan que levaduras tratadas a 400 MPa/20-25°C/10 min muestran una ligera alteración en su forma exterior, así como alteraciones en la membrana nuclear; entre 400 y 600 MPa aparecen alteraciones en las mitocondrias y el citoplasma y el daño estructural va acompañado del vertido de sustancias al exterior de la célula (glutacion, K^+ , Mn^{++} , Mg^{++} , Zn^{++}). Butz y col. (1996) describen alteraciones en la estructura de las ascosporas del hongo termorresistente y barorresistente *Byssochlamys nivea* tratadas a 700 MPa durante 60 min a 70°C. Observan la disolución de los grupos de ascosporas y la aparición de profundas arrugas en la superficie de las células individuales.

1.7.1.2 Pared y membrana celulares.

Russell y col. (1995) observan cómo la composición lipídica de la membrana celular de cepas de *Lactobacillus plantarum* condiciona una mayor o menor resistencia a los tratamientos por alta presión. Un aumento del contenido de la membrana en difosfatidilglicerol causa una pérdida de fluidez (o aumento de la resistencia mecánica) en la membrana al interaccionar aquél con el Ca^{++} presente en el medio. Las células con mayor contenido en difosfatidilglicerol son más susceptibles a las alteraciones inducidas por la alta presión. En general, un aumento en la fluidez de

la membrana causa una disminución de la sensibilidad a la alta presión. Esta afirmación estaría de acuerdo con las observaciones de MacDonald (1992) que señala que la presión aumenta el orden en la membrana plasmática y ello causa la separación de sus proteínas integrales y periféricas. Así, membranas más fluidas serían más resistentes a la ordenación inducida por la alta presión. La hipótesis lanzada por Smelt (1993) según la cual la ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ puede quedar inactivada al separarse de la membrana celular también se ve reforzada por esta teoría.

Isaacs y col. (1995) detectan el vertido de material intracelular al tratar células de *E. coli* a presiones de 400 MPa durante tiempos entre 1 y 4 min. El material vertido incluye proteína y aminoácidos. En sus observaciones no aclaran si la membrana es permeable sólo bajo presión o si queda permanentemente alterada. Los mismos investigadores tratan células de *Listeria monocytogenes* a 250 MPa y observan la aparición de áreas aclaradas simétricas y desprovistas de ribosomas en el citoplasma adyacente a la membrana, pudiendo deberse a cambios de fase o conformacionales de la membrana o a la destrucción local de ribosomas.

Hauben y col. (1996) observan la pérdida del enzima periplásmico β -lactamasa cuando trataban suspensiones de *E. coli* en tampón fosfato a 180-320 MPa/22-25°C/15 min, lo que sugiere que la alta presión causa una disrupción en la membrana externa que afecta a la permeabilidad de las proteínas solubles en agua. Los autores comprueban que este daño es rápidamente reparado después de la descompresión, si bien una parte importante de las células supervivientes al tratamiento quedan dañadas, pues son sensibles a las sales biliares y al cristal violeta.

Chilton y col. (1997a) indican que cuando una bacteria es sometida a presiones entre 200 y 600 MPa se abren brechas en la membrana que no sólo permiten el vertido de material celular sino también la entrada de material extracelular. En condiciones normales, las sales biliares no pueden atravesar la membrana exterior (bicapa lipídica) y el NaCl no puede penetrar la membrana interior (peptidoglicano), sin embargo, bajo presión, las células tratadas mueren después de la exposición a estas sales. Los autores presurizan células con ellas y después intentan recuperarlas en distintas condiciones que permitan la descripción de los procesos implicados en la reparación. Sus conclusiones apuntan a que la membrana exterior puede recuperarse

espontáneamente del daño inducido por la presión sin la necesidad de la intervención de los procesos enzimáticos de la célula (síntesis de proteínas, ARN, ATP y proteoglicanos) pero éstos sí son necesarios para la reparación de la membrana citoplasmática.

Probablemente, la alteración de la membrana celular sea la principal causa de la aparición de microorganismos *estresados* después del tratamiento de alta presión, un fenómeno que ha sido descrito por varios autores (Metrick, 1989; Styles, 1991; Raffalli y col., 1994; Patterson y col., 1995b) y que es el causante de que las células supervivientes no puedan crecer en medio selectivo y necesiten un período de recuperación.

Numerosos investigadores están trabajando en los efectos de la alta presión sobre la compresibilidad y los cambios de fase de las membranas biológicas dependiendo de su contenido en fosfolípidos y colesterol y los enzimas relacionados con ellas (Beney y col., 1997; Scarlata y Rebecchi, 1997; Tauc y col., 1997 y Winter y Czeslik, 1997) con el fin de acercarse al conocimiento de las consecuencias bioquímicas que pueden derivarse de la aplicación del tratamiento.

1.7.1.3 Reacciones metabólicas.

La inactivación de enzimas clave para la función celular puede explicar parte de los efectos inhibitorios de la alta presión sobre los microorganismos. Parece que la presión tiene diferentes efectos sobre las reacciones catalizadas por enzimas en una misma célula (Hoover, 1989). Por ejemplo, la actividad de la deshidrogenasa del ácido succínico de *E. coli* se enlentece a 20 MPa y, en cambio, a 60 MPa no se afectan las actividades de las deshidrogenasas de los ácidos fórmico y málico, mientras que a 100 MPa los tres enzimas son inactivos. Isaacs y col. (1995) ha detectado una disminución del 90% de la actividad inicial del enzima isocitrato deshidrogenasa por después de tratar células de *E. coli* a 400 MPa durante 2 min.

La inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la membrana celular se ha apuntado como uno de los mecanismos que conducen a la destrucción de los microorganismos (Smelt, 1993). La inhibición de este enzima, ya sea por desnaturalización o por dislocación de la membrana celular, interrumpiría la hidrólisis del ATP necesario para

mantener el flujo de protones que garantiza la homeostasis celular. A consecuencia de ello, el pH interno de la célula caería y se produciría la muerte celular. Fortes y col. (1995) también han estudiado los efectos de presiones hasta 250 MPa sobre esta enzima: entre 0,1 y 150 MPa, la presión altera su actividad de manera reversible, mientras que entre 150 y 250 MPa se inactiva irreversiblemente.

Las vacuolas de las levaduras son orgánulos de composición ácida involucrados en la homeostasis celular y la degradación de las proteínas. Una H^+ -ATPasa vacuolar (V- H^+ -ATPasa) es la encargada de mantener su pH ácido. Entre 40 y 60 MPa se induce la acidificación de las vacuolas de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Abe y Horikoshi, 1995), mediada por la activación de la V- H^+ -ATPasa (Abe y Horikoshi, 1997). En cambio, como acabamos de ver, presiones más elevadas inactivan las Na^+ - K^+ -ATPasa y Ca^{++} -ATPasa de la membrana celular.

La biosíntesis proteica se inhibe a causa de la disociación de los ribosomas, que *in vivo* se produce a partir de los 100 MPa (Groß y col., 1992)

1.7.1.4 Mecanismos genéticos.

Los ácidos nucleicos son mucho más resistentes a la desnaturalización por alta presión que las proteínas. Se ha observado que 1000 MPa/25°C-40°C/60 min no alteran la estructura nativa del ADN. La diferencia en la tolerancia a la presión entre el ADN y las proteínas puede ser debida a la gran cantidad de puentes de hidrógeno intramoleculares que presenta la molécula de ADN (Hoover, 1989). En cambio, Isaacs y Chilton (1995) observan la aparición de zonas de ADN fibrilar después de tratar células de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* a 250 MPa. Esta alteración supone una mínima pérdida de viabilidad en la población tratada. La exposición a 500 MPa causa un aumento marcado de las regiones de ADN fibrilar. Chilton y col. (1997a) han observado que el ADN de *Escherichia coli* aparece agrupado y que en lugar de la distribución uniforme de ribosomas por toda la célula, aparecen áreas sin ellos y áreas con más densidad. Lo atribuyen a una agregación de subunidades de ribosomas o de proteínas citoplasmáticas. Han evidenciado la rotura de la cadena de ADN y de ARN ribosomal, los cuales no se afectan cuando son presurizados *in vitro* (100 MPa/24 h), pero sí *in vivo*. Esto sugiere que la degradación

del ADN y ARN *in vivo* es un efecto indirecto de la presión en el que puede estar implicada la actividad de la ADNasa y la ribonucleasa. Los investigadores citados se cuestionan sobre la relevancia que representan los daños en el ADN en la inactivación microbiana, puesto que, por un lado se ha observado que mutantes de *E. coli* deficientes en los mecanismos de reparación del ADN son más sensibles a la presión que las células no mutadas y por otro, cepas de *Deinococcus radiodurans* deficientes en dichos mecanismos de reparación no son más sensibles a la presión que las células originales (Chilton y col., 1997b).

Los enzimas implicados en la replicación y transcripción del ADN también quedan afectados por la alta presión (Hoover, 1989). Wong y col. (1989) describen cambios conformacionales inducidos por alta presión en la proteína represora de la metionina de las células de *E. coli*.

1.7.2 Factores que afectan a la sensibilidad de las células vegetativas a la alta presión.

1.7.2.1 Estado fisiológico de las células.

Las células en fase estacionaria son más resistentes a la presión que las células en fase logarítmica de crecimiento. Las bacterias en fase estacionaria son más pequeñas y esféricas que en fase de crecimiento, y la acumulación de componentes como proteínas y carbohidratos puede reducir los efectos de la presión (Isaacs y Chilton, 1995). Chilton y col. (1997) observan que las células de *Escherichia coli* en fase estacionaria son más resistentes a la alteración de la membrana celular que las células en fase exponencial. La distribución de las fases de crecimiento en un mismo cultivo puede determinar la aparición de cinéticas de inactivación de segundo orden, en las cuales una primera fracción de la población se inactiva rápidamente y una segunda ofrece más resistencia (Earnshaw, 1995). La forma de la curva de la cinética de inactivación puede estar también influida por el resto de los factores que mencionaremos a continuación.

1.7.2.2 Variaciones inter- e intra- especies.

Las células vegetativas de los microorganismos varían en su sensibilidad a la alta presión y como ya hemos mencionado al inicio de este apartado, por lo general, los microorganismos gram positivos son más resistentes a sus efectos que los gram negativos (Cheftel, 1995 y Earnshaw, 1995). Estudios más recientes sugieren que no

parece existir relación con el tipo gram, sino con la morfología de las células. Ludwig y Schreck (1997) apuntan tres categorías de bacterias con respecto a su sensibilidad a la presión: las más sensibles serían las células con forma bacilar, las más resistentes las esféricas, y las bacterias medianamente sensibles corresponderían a la variedad de formas existentes entre bacilos cortos y cocos (Tabla I.1).

Tabla I.1 Sensibilidad a la presión de las células vegetativas a temperatura ambiente. La presión más baja indica el inicio de la reacción de inactivación, la más alta marca la velocidad de inactivación máxima (presiones mayores no aceleran la inactivación). Los signos + y - indican el tipo gram. (Ludwig y Schreck, 1997).

Microorganismo	Intervalo de presión (MPa)
<i>P. aeruginosa</i> (bacilos alargados)-	150-300
<i>B. subtilis</i> (bacilos alargados)+	150-300
<i>B. stearothermophilus</i> (bacilos)+	150-300
<i>Serratia marcescens</i> (bacilos)-	150-300
<i>Clostridium sticklandii</i> (bacilos)+	150-300
<i>Escherichia coli</i> , cultivados con flujo de O ₂ (bacilos)-	150-300
<i>Escherichia coli</i> , cultivados aeróbicamente	150-300
<i>Escherichia coli</i> , cultivados con deficiencia de O ₂	200-300 y 400-450
<i>Kurthia zopfii</i> (bacilos cortos o cocos)+	200-250 y 400-450
<i>Corynebacterium renale</i> (corineiforme, pleomórfico)+	225-375
<i>Paracoccus denitrificans</i> (cocos o bacilos cortos)-	250-300 y 400-500
<i>Micrococcus luteus</i> (cocos)+	300-450
<i>Staphylococcus aureus</i> (cocos) +	350-500

Earnshaw (1995) también coincide en señalar al género *Staphylococcus* como uno de los más resistentes a la alta presión.

Patterson y col. (1995a) encuentran variaciones significativas en la sensibilidad a la alta presión (700 MPa/20°C) de diferentes cepas de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* suspendidas en tampón fosfato. Otros autores han hallado cepas de distintas especies que muestran gran resistencia a la alta presión. Hauben y col. (1997a y b) han seleccionado mutantes de *E. coli* exponiendo a los microorganismos a ciclos alternos de alta presión y cultivo de los supervivientes. La resistencia a la temperatura de los mutantes seleccionados también se ve alterada. Al analizar la composición en ácidos grasos de las membranas de las distintas células, no hallan diferencias significativas que puedan explicar el aumento de resistencia. Según

los autores, parece probable que esta selección pueda suceder en cepas patógenas de *E. coli* y especies relacionadas y habrá que tenerlo en cuenta a la hora de diseñar los equipos para minimizar la posibilidad del establecimiento de cepas barotolerantes en ellos. En un estudio complementario Verroens y col. (1997) aplican 10 ciclos alternos de alta presión e incubación a presión atmosférica para seleccionar mutantes de distintas especies: después del tratamiento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Yersinia enterocolitica* no se observa ningún aumento en la resistencia; al tratar *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y distintas especies de *Escherichia*, se observa un ligero aumento de la resistencia a la presión (50-100 MPa) de las células seleccionadas respecto a las células originales. Al aplicar una ulterior selección sobre las células de *Salmonella* y *Shigella* se consiguen cepas resistentes que requieren 300 MPa más que las células originales para ser inactivadas. Concluyen que distintos organismos difieren significativamente en la capacidad de desarrollar resistencia a la presión y que en algunos casos dicha capacidad no existe.

Fujii y col. (1997) caracterizan un mutante barotolerante de *Saccharomyces cerevisiae* y determinan que los niveles intracelulares de trealosa y el aumento de la fluidez de la membrana son esenciales para la barotolerancia y la termotolerancia durante la fase estacionaria.

1.7.2.3 Magnitud y duración de la presión.

Por lo general, un aumento en la magnitud de la presión aumenta el efecto letal, pero no lo hace siempre un aumento del tiempo de tratamiento. En algunos casos, las reacciones de inactivación son de primer orden, aunque, como hemos mencionado, no es siempre así, y se han observado casos complejos de reacciones de inactivación. Normalmente, para una cepa bacteriana dada, la cinética varía según la temperatura (Ludwig y Schreck, 1997).

1.7.2.4 Temperatura.

Takahashi (1992) estudia los efectos de la alta presión a temperaturas entre -20 y 20°C en trece especies de microorganismos en tampón fosfato. En la mayoría de los casos, se consigue la inactivación total con 200 MPa/20 min en los tratamientos a -20°C, mientras que en los tratamientos a 20°C sólo se obtiene una ligera inactivación.

Según Ludwig y col. (1992) la inactivación de *Escherichia coli* a 200 MPa durante 15 min presenta un mínimo a 20°C, mientras que a temperaturas inferiores o superiores el efecto de la presión es mayor y el máximo se consigue a partir de los 40°C. Smelt y Rijke (1992) obtienen unos resultados similares tratando a 300 Mpa/15 min. Carlez y col. (1993) observan un efecto similar al tratar *Citrobacter freundii* y *Listeria innocua* inoculados en carne picada de buey. Gervilla y col. (1997a y b), al tratar *Listeria innocua* y *Pseudomonas fluorescens* inoculadas en leche de oveja, detectan que la resistencia a la presión es mayor a 25°C que a 2°, 10° o 50°C. Por otro lado, la resistencia a la alta presión de *Escherichia coli* es mayor a 10°C que a 25°C.

1.7.2.5 Medio.

Ludwig y col. (1992) observan que la velocidad de inactivación de células de *Escherichia coli* es la misma en medio nutritivo, en solución fisiológica de NaCl o en una mezcla 1:1 de solución de NaCl y glicerol. En cambio, se reduce la inactivación a un 60% cuando las células son suspendidas en glicerol puro, probablemente debido a influencias sobre la membrana.

Takahashi (1992) investiga el efecto de distintos ingredientes alimentarios sobre la proporción de supervivientes de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* después del tratamiento. De los estudiados, el NaCl aumenta la proporción de supervivientes.

Fujii y col. (1995) observan el efecto protector frente a la presión de varios mono- y disacáridos en células de *Saccharomyces cerevisiae*. Oxen y Knorr (1993) describen el efecto protector de distintas soluciones de sacarosa, glucosa, fructosa o NaCl en las que se encuentran suspendidas células de *Rhodotorula rubra*. Dicho efecto empezó a observarse a valores de a_w por debajo de 0,92. Mackey (1995) observó el efecto protector de una solución de xilitol al 15% sobre células de *Listeria monocytogenes* en fase logarítmica de crecimiento. Está comprobado que varias macromoléculas depresoras de la a_w poseen un efecto estabilizador frente a la desnaturalización térmica. Por otro lado, los mismos autores comprueban que la presencia de butilhidroxianisol, sorbato potásico o condiciones ácidas en el medio sensibilizan a las células de *Listeria* en fase estacionaria a los efectos de la alta presión.

Patterson y col. (1995) compararon el efecto de 700 MPa/20°C sobre distintas cepas de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* inoculadas en tampón fosfato, leche UHT y carne de pollo. En todos los casos, los microorganismos son más resistentes a la presión cuando se tratan en leche UHT que en carne de pollo o tampón fosfato. Metrick (1989) y Styles (1991) observan el mismo efecto protector del alimento con respecto a la solución tampón cuando *Salmonella* y *Listeria* son tratadas en carne de pollo y en leche UHT, respectivamente. Dichos autores evidencian la presencia de células dañadas subletalmente cuando se utilizan presiones inferiores a las requeridas para causar la destrucción total de los microorganismos.

Evidentemente, el pH del medio también influye sobre la reducción del número de microorganismos cuando se aplica un tratamiento de alta presión.

Como hemos observado, los distintos componentes de los alimentos juegan un papel protector o sensibilizador dependiendo de los casos, pero además hay que tener en cuenta el efecto que pueda representar la matriz física en la que se hallan ubicados los microorganismos.

1.7.3 Esporas.

En lo referente a la sensibilidad a la presión, la división más importante en las bacterias se encuentra entre las formas vegetativas y las esporuladas. Por lo general, las células vegetativas se inactivan entre 400-600 MPa, pero en el caso de las esporas resisten presiones superiores a los 1000 MPa si no se aumenta la temperatura por encima de los 45-75°C dependiendo de los casos. Como sucede con las células vegetativas, la resistencia a la presión de las esporas de las distintas especies y cepas de microorganismos varía enormemente (Gould, 1995).

Timson y Short (1965) sugieren que la resistencia de las esporas a la alta presión es debida a la presencia del ácido dipicolínico, que las protege de la solvatación e ionización excesivas, causantes de los efectos letales en las células vegetativas. Gould, en 1986, sugiere la existencia de un estado altamente viscoso en el interior de la spora que contribuye a la resistencia y al estado de latencia. El autor cuestiona si, así como el aumento de la temperatura y de la hidratación pueden mover

ese estado hacia una zona de transición en que la espora inicia la germinación, la alta presión también es capaz de ello (Knorr, 1995).

Clouston y Wills (1969) estudian el efecto que se acaba de mencionar en esporas de *Bacillus pumilus*, y observan que la iniciación de la germinación ocurre a presiones por encima de los 50 MPa. Gould y Sale (1970), trabajando con esporas del mismo género indican que las presiones más efectivas se encuentran por debajo de los 100 MPa. Con un tratamiento de 25 MPa/30 min a temperaturas por debajo de los 30°C el porcentaje de germinación es muy bajo en la mayoría de las cepas estudiadas y aumenta considerablemente a partir de los 40°C. Además de las temperaturas bajas, los valores extremos de pH también inhiben la germinación. Los inhibidores de la germinación iniciada por presión son los mismos que inhiben la germinación iniciada por nutrientes, lo que sugiere que la presión inicia la germinación a través de la aceleración de algunas reacciones enzimáticas, más que a través de una simple distorsión física de la espora, y también a través de un aumento en la permeabilidad de alguna de las barreras de la espora a la L-alanina y los α -aminoácidos relacionados, potenciadores de la germinación.

Craven (1988) observa que la germinación de las esporas se mejora con tratamientos que rompen las interacciones hidrofóbicas, por ejemplo con la presencia de CaCl_2 y etanol. Como se ha mencionado, la alta presión desestabiliza las interacciones hidrofóbicas, de manera que, de acuerdo con Craven (1988), éste podría ser el mecanismo por el cual se favorece la germinación.

Sojka y Ludwig (1994) indican que las presiones situadas entre 60 y 150 MPa son las más adecuadas para iniciar la germinación de esporas de *Bacillus subtilis*. Consiguen reducir en un factor de 10^6 el número de esporas viables en solución acuosa con un tratamiento de germinación de 60 MPa/40°C/210 min seguido de un tratamiento de inactivación de 500 MPa/40°C/10 min. El número resultante de esporas es inferior a 100 UFC/ml. Para conseguir soluciones estériles es necesario aumentar la temperatura a 50°C y aplicar un tratamiento de múltiples etapas alternando las presiones de 60 y 500 MPa durante 3 h.

Nishi y col. (1994) indican que la activación de la germinación de esporas de

Bacillus subtilis en leche entera a presiones de 200 MPa y temperaturas entre 25 y 60°C es más efectiva que la activación por calor a 80°C. No observan grandes diferencias entre la utilización de 50 y 200 MPa para iniciar la germinación. Consiguen germinar la mayoría de esporas al cabo de una hora de incubación a 37°C a las presiones mencionadas. Las esporas residuales que no germinan muestran un estado de latencia profundo, y tampoco lo hacen después de una incubación de 6 h. Hölters y col. (1997) provocan la germinación de esporas de *Bacillus subtilis* suspendidas en solución salina fisiológica con tratamientos a 60 MPa/30°C/15 min y 30 MPa/50°C. Según Heinz y Knorr (1997) el papel de la alta presión en la inducción de la germinación está restringido a la activación de enzimas específicos, que se produce en un intervalo de presión entre 50 y 250 MPa.

Otros autores proponen la aplicación de un tratamiento combinado a temperaturas más elevadas y prescindir de la germinación previa para conseguir la inactivación de las formas esporuladas.

Hayakawa y col. (1994a y b) aplican tres tipos distintos de tratamiento para conseguir la destrucción de esporas de *Bacillus stearothermophilus* en tampón fosfato: un tratamiento continuo de 600 MPa/70°C/60 min; un tratamiento oscilatorio, de 6 ciclos de 600 MPa/70°C/5 min cada uno; y un tratamiento de 6 pulsos, subiendo la presión a 600 MPa/70°C con un tiempo de mantenimiento inferior a 1 s. En todos los casos el tiempo de descompresión es inferior a 1 s. El tratamiento continuo supone una reducción desde 10^6 hasta 10^2 UFC/ml. Con los tratamientos oscilatorio y por pulsos se consigue la esterilidad de las muestras. Con la técnica de microscopía electrónica de barrido se observa que las esporas sometidas al tratamiento oscilatorio presentaban roturas en la superficie. Los autores señalan la posibilidad que el mecanismo de destrucción de las esporas sea debido a la velocidad de expansión adiabática del agua y la pared de la espora al realizarse la descompresión o bien a cambios en la permeabilidad del agua a través de la pared y el protoplasma de la espora.

Reddy (1997) estudia la inactivación de una suspensión de 10^6 esporas/ml de *Clostridium botulinum* tipo E en tampón fosfato, combinando presiones entre 414 y 828 MPa con temperaturas entre 25 y 60°C durante 5 y 10 min. Las temperaturas por

debajo de 35°C no tienen efecto sobre la destrucción de esporas en ninguna de las presiones ensayadas. A 828 MPa/45°C/5 min y a 828/40°C/10 min se consigue una reducción de 5 unidades logarítmicas. Balasubramaniam y col. (1997) estudian el efecto de la temperatura y la presión sobre la destrucción de suspensiones de 10⁸ esporas de *Bacillus subtilis*/ml. Temperaturas inferiores a 40°C combinadas con 828 MPa no tienen ningún efecto sobre la destrucción de las esporas. Se consigue la inactivación completa tratando a 828 MPa/60°C/10 min. Rovere y col. (1997) aplican la alta presión combinada con temperatura para conseguir la inactivación en medio líquido de distintas esporas, con los resultados que se muestran en la Tabla I.2.

Tabla I.2 Efecto de la alta presión combinada con el tratamiento térmico en la inactivación de esporas.

Microorganismo	Tratamiento	Inactivación
<i>Bacillus cereus</i>	800 MPa/ 60°C/ 5 min	Total
<i>Bacillus licheniformis</i>	800 MPa/ 60°C/ 5 min	Total
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	900 MPa/ 70°C/ 5 min	Total
<i>Bacillus coagulans</i>	900 MPa/ 70°C/ 5 min	Parcial
<i>Clostridium botulinum</i> (10 ⁵)	800 MPa/ 65°C/ 17 min	Total
<i>Clostridium sporogenes</i> (10 ⁵)	800 MPa/ 90°C/ 5 min	Total

1.7.4 Virus.

La presión entre 600-1600 MPa causa una disociación reversible de las subunidades del virus del mosaico del tabaco, si bien a partir de 1400 MPa la reasociación de las unidades conduce a la formación de agregados amorfos, lo que indica que se han producido cambios conformacionales en las unidades separadas (Silva y col., 1988). También se ha observado la disociación reversible de las partículas del bacteriófago R17 después del tratamiento a 250 MPa (Da Poian y col., 1993).

Nagakami y col. (1992) consiguen la inactivación del virus del herpes simplex (HSV-1) y del citomegalovirus humano (HCMV) a 300 MPa/25°C/10 min. En el examen microscópico detectan que la cubierta del virus queda alterada, con lo que se pierde su capacidad infectiva. En cambio, a 600 MPa no consiguen alterar la capacidad infectiva de un poliovirus sin cubierta, pues a estas presiones el ADN permanece intacto.

Se ha estudiado el efecto inhibitor de la alta presión sobre la infectividad del

virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Otake y col., 1997). Distintas cepas del mismo virus difieren en su sensibilidad a la presión, que debe ser siempre superior a los 400 MPa para conseguir la inactivación. El tratamiento disminuye la actividad de la transcriptasa inversa del virus, lo que se correlaciona con una disminución de su infectividad, y además daña la estructura de las partículas víricas.

Tomando como modelo el virus de la estomatitis vesicular, Silva y col. (1992) comprueban que los virus con cubierta conservan su inmunogenicidad después de haber sido tratados por alta presión con el fin de disminuir su infectividad, lo que permitiría la obtención de vacunas con este tratamiento. Pontes y col. (1997) estudian la inactivación de virus que afectan al ganado vacuno para la posterior elaboración de vacunas, observando que los virus inactivados conservan sus propiedades inmunogénicas, probablemente debido a que los cambios estructurales necesarios para la inactivación son muy sutiles y consisten exclusivamente en la alteración de la disposición física de las distintas partes de los virus estudiados. Perche y col (1997) inactivan el virus de la Fiebre del Valle del Rift aplicando un tratamiento de 275 MPa/30 min. Al observar los virus al microscopio registran tres tipos de cambios: invaginaciones, disrupciones de la membrana y agregación de viriones, lo que sugiere que la alta presión causa alteraciones en la cubierta vírica y probablemente perturba las interacciones virus-célula.

1.7.5 Efecto de la alta presión sobre los parásitos.

Butz y Tauscher (1995) aplican alta presión a frutas y vegetales con el fin de inactivar los huevos de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*) presentes en ellos. Las larvas se desarrollan sin problemas después de un tratamiento a 100 MPa/25-32.5°C/20 min, pero no se hallan supervivientes a partir de 125 MPa.

También se ha observado que parásitos presentes en carne y pescado (triquina, tenia, trematodos) pueden ser inactivados con tratamientos de alta presión. Ohnishi y col. (1993) estudian la inactivación de larvas de *Trichinella spiralis* en músculos infectados: son necesarios tratamientos de 200 MPa/25°C/10 min para conseguir la inactivación y la pérdida de infectividad de las larvas.

1.7.6 Utilización de tratamientos combinados.

Ya hemos mencionado la necesidad de aumentar la temperatura de tratamiento en muchos casos para conseguir la inactivación total de los microorganismos. Se ha propuesto la combinación de la alta presión con otros tratamientos para conseguir el mismo objetivo.

Kalchayanad y col., (1994) proponen la combinación de bacteriocinas para alcanzar mayor efectividad antibacteriana que con la alta presión o la electroporación aisladamente. Ambos tratamientos producen daños subletales en las células de los microorganismos supervivientes que provocan la sensibilización a la pediocina AcH y a la nisina tanto en microorganismos gram positivos como negativos.

Roberts y Hoover (1996) investigan los efectos combinados de la alta presión, el calor, la acidez y la nisina sobre las esporas de *Bacillus coagulans* suspendidas en tampón fosfato-citrato. Los resultados del trabajo indican que la nisina puede tener un efecto sinérgico usada conjuntamente con la presión a temperaturas moderadas (400 MPa/45 y 70°C/15 y 30 min) y pH bajos. Stewart y col. (1997) realizan un estudio similar con esporas de *Clostridium sporogenes*.

Se ha observado también que el efecto letal del peróxido de hidrógeno sobre esporas de *Bacillus megaterium* mejora combinado con la alta presión (Marquis, 1997).

El tratamiento de alta presión (238 MPa) de poblaciones de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Saccharomyces cerevisiae* tratadas previamente con chitosan provoca un aumento de la letalidad, si bien se observa un efecto aditivo y no sinérgico entre los dos tratamientos (Papineau, 1991).

Adegoke y col. (1997) investigan el efecto sinérgico de la alta presión y componentes de los aceites esenciales (monoterpenos) en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* y sugieren su uso como aditivos para mejorar la acción letal de la alta presión. Se ha propuesto también la combinación de la alta presión con la corriente alterna (Shimada, 1992) y con los ultrasonidos (Knorr, 1995) para aumentar el efecto letal.

1.8 Efectos de la alta presión sobre los componentes de los alimentos.

1.8.1 Agua.

El agua es el componente mayoritario de muchos alimentos y además suele ser el medio a través del cual éstos reciben el tratamiento de alta presión. Por ello, los efectos de la alta presión sobre el agua son de máxima importancia para interpretar los cambios que se producen al aplicar esta tecnología.

A temperatura ambiente el agua experimenta una reducción de volumen de aproximadamente un 4% cuando es sometida a una presión de 100 MPa y del 15% cuando la presión aumenta a 600 MPa. Los alimentos con gran cantidad de agua y poco gas presentan una compresibilidad parecida a la del agua (Cheftel, 1992).

El producto iónico del agua aumenta al incrementar la presión y la temperatura. Así mismo, la presión también mejora la disociación de los ácidos y bases débiles. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que al comprimir materiales biológicos no tamponados pueden producirse cambios drásticos en el pH (Lüdemann, 1992). En zumos de fruta, ácidos inicialmente, un tratamiento de 500 MPa causa una disminución en el pH de aproximadamente una unidad. El aumento de la disociación del agua y la disminución del pH se explica por el fenómeno de electrostricción que hemos mencionado anteriormente (Cheftel, 1995). Como ya hemos visto, la compresión del agua conduce a un aumento de temperatura (2-3°C por cada 100 MPa).

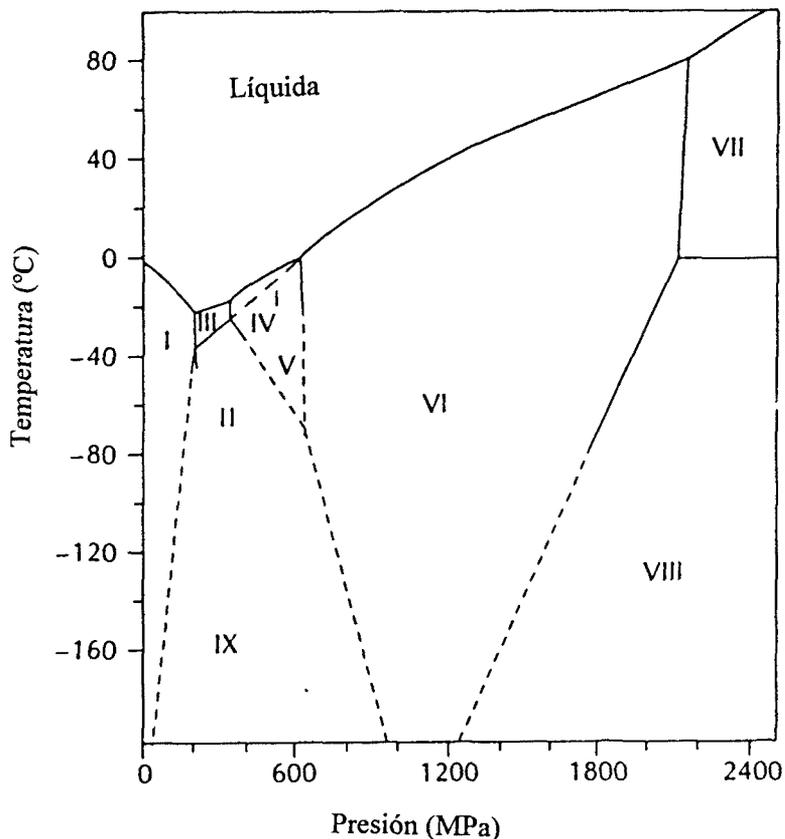
Las transiciones de fase del agua también se ven afectadas al aumentar la presión: en la Figura I.2 puede observarse que a temperatura de congelación y presiones cercanas a los 200 MPa el agua se mantiene en estado líquido, debido a que la presión se opone al aumento de volumen causado por la formación de los cristales de hielo de tipo I. A medida que la presión aumenta se forman otros tipos de cristales, incluso a temperatura ambiente (tipos II a VIII). Los cristales de tipo I son los únicos que al formarse causan un aumento de volumen mientras que la formación de los demás implica una ausencia de cambio o una pequeña disminución de volumen respecto al estado líquido, lo que implica un menor daño en los tejidos que el que producen los cristales de tipo I. (Kalichevsky, 1995). Estos fenómenos ofrecen importantes aplicaciones prácticas:

1. Almacenaje en congelación bajo presión (cristales de tipo VI) sin necesidad de

enfriamiento. La presión requerida es muy elevada (900 MPa) y no se han realizado experimentos en este área.

2. Aceleración de la descongelación bajo presión (110-200 MPa), de especial utilidad cuando las muestras se alteran significativamente durante la descongelación (en los campos médico y alimentario).
3. Almacenaje de productos a bajas temperaturas (entre 0 y -20°C) sin formación de cristales de hielo. El tiempo de almacenaje puede quedar limitado por la actividad enzimática, que no se ve tan reducida como en la congelación.
4. Congelación ultrarrápida, que se produciría al realizar la descompresión de muestras a las que hubiéramos bajado la temperatura hasta -22°C hallándose a 207.5 MPa.

Figura I.2 Diagrama de fases del agua (según Kalichevsky, 1995).



Kanda y Aoki (1993) ensayan la congelación rápida en tofu, bajando la temperatura hasta -18°C mientras la muestra se halla sometida a 200 MPa. Al producirse la descompresión se consigue una congelación ultrarrápida del producto y una formación de cristales de hielo de tamaño inferior al de los formados en una congelación normal. Al

descongelar a temperatura ambiente, el tofu congelado por cambio de presión es el que presenta menos pérdida de agua y una estructura más homogénea. Fuchigami y col. (1995) estudian el efecto de la congelación por cambio de presión sobre la textura y la estructura histológica de rodajas de zanahoria. Dependiendo de la presión utilizada el tipo de cristales de hielo formados es distinto y el menor daño estructural se observa a las presiones de 200 MPa (líquido), 340 MPa (cristales de tipo III) y 400 MPa (cristales tipo V). La textura y la estructura de las zanahorias así tratadas resultan mejores que las de zanahorias congeladas a -30°C en un proceso convencional. A 100 MPa (cristales tipo I) o 700 MPa (cristales tipo VI) se altera la textura del vegetal.

Diversos grupos de investigación están trabajando en el desarrollo de modelos para los procesos de congelación y descongelación en los que interviene la alta presión (Chourot y col., 1995; Denys y col., 1997 y Otero y col., 1997).

1.8.2 Lípidos.

Los estudios sobre los efectos de la alta presión sobre los lípidos y sus mezclas se han centrado principalmente en los cambios de fase ya que este proceso puede hallarse en el origen de la destrucción de las membranas biológicas (Heremans, 1992).

El punto de fusión de los lípidos aumenta en más de 10°C por cada 100 MPa. Así, los lípidos que a temperatura ambiente se encuentran en forma líquida cristalizan bajo presión, formándose cristales más densos y estables (Cheftel, 1992). Yasuda y Mochizuki (1992) utilizan la alta presión para solidificar manteca de cacao y obtener el mismo efecto que se produce durante el temperado del chocolate. Observan que aplicar 150 MPa produce el mismo efecto que bajar la temperatura de la manteca de cacao 20°C . Buchheim y col. (1996a, b) estudian la fracción grasa de la mantequilla, manteca de cerdo, sebo de ternera, aceite de coco y de palma y observan que la temperatura característica de cristalización aumenta de media unos 15°C por cada 100 MPa de presión aplicada. También estudian el efecto de la presión en emulsiones tipo o/w de grasa de leche, observando que provoca una iniciación o una aceleración de la cristalización de la grasa.

Kanno y Uchimura (1997) estudian el efecto de la alta presión sobre las propiedades físico-químicas de los glóbulos grasos de la leche de vaca y su membrana,

compuesta por un 44% de proteínas y un 55% de lípidos. El tratamiento a 600 MPa no afecta al diámetro medio ni a la distribución de tamaños de los glóbulos de grasa. Para evaluar si se producen alteraciones en la membrana del glóbulo graso ponen en contacto lipoproteín-lipasa con glóbulos de grasa presurizados a 500 MPa, sin observar aumento en la proporción de ácidos grasos libres. Al tratar membranas aisladas observan su agregación. La agregación de los glóbulos grasos de la nata líquida (35% de grasa) había sido observada anteriormente por Dumay y col. (1996) así como la inducción de la cristalización causada por alta presión.

Cheah y Ledward (1996) y Angsupanich y Ledward (1997) aplican tratamientos de alta presión a temperatura ambiente a carne de cerdo y pescado respectivamente y ambos comprueban que las muestras presurizadas sufren una oxidación lipídica superior a la de las muestras no tratadas y comparable a la inducida por calor. Ambos estudios sugieren que la desnaturalización inducida por presión puede liberar metales como cobre o hierro, que catalizan la oxidación lipídica.

1.8.3 Proteínas.

Las interacciones hidrofóbicas, que juegan un rol sustancial en la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas y en las interacciones proteína-proteína, se desestabilizan por alta presión, lo que explica el hecho de que las proteínas oligoméricas sean muy sensibles a la alta presión y se disocien a presiones inferiores a 200 MPa. En general, los efectos de la presión sobre la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas son reversibles, pero después de la descompresión, el replegamiento de la proteína puede llegar a ser muy lento y se observan comportamientos de histéresis y derivas conformacionales antes de alcanzar de nuevo el estado nativo (Masson, 1992 y Heremans, 1995). Como hemos mencionado, en general, la alta presión estabiliza los puentes de hidrógeno, importantes para las estructuras secundarias de las proteínas, como las α -hélices o las estructuras β . Podemos observar efectos sobre la estructura secundaria a presiones a partir de 300 MPa, aunque en algunos casos deben ser superiores a 700 MPa (Wong y Armstrong, 1992; Balny y Masson, 1993) y son debidos a cambios conformacionales, sobretodo en la estructura α -hélice. La desnaturalización debida a cambios en la estructura secundaria suele ser irreversible, dependiendo del grado de compresión, de la composición del medio y de si se producen modificaciones químicas, como

oxidaciones de grupos tiol o reacciones de agregación, que pueden conducir a la formación de geles diferentes de los que se obtienen aumentando la temperatura.

Según Masson (1992), los cambios en la hidratación son la mayor fuente de disminución de volumen que está asociada a la disociación y desplegamiento de las proteínas, y están causados por:

- la ionización inducida por presión: ya hemos mencionado anteriormente el fenómeno de la electrostricción del agua alrededor de los grupos cargados,
- la solvatación de grupos polares a través de puentes de hidrógeno, puesto que cadenas laterales de aminoácidos que antes no estaban accesibles al solvente, ahora quedan expuestas a éste,
- hidratación hidrofóbica, debida a la estructuración del agua alrededor de grupos apolares expuestos ahora al solvente.

La desnaturalización inducida por presión, combinada con otros factores, como cambios en el pH y la temperatura, presenta importantes consecuencias y aplicaciones prácticas, algunas de las cuales expondremos a continuación sin pretender ser exhaustivos, pues los estudios realizados hasta el momento abarcan una gran diversidad de proteínas. Mencionaremos algunos de los trabajos más significativos acerca de los efectos de la alta presión sobre su función.

1.8.3.1 Sobre la función de las proteínas.

1.8.3.1.1 Enzimas.

Los posibles efectos de la alta presión sobre los enzimas van desde cambios en la velocidad de las reacciones que éstos catalizan, hasta cambios conformacionales en el enzima o su disociación en subunidades, que pueden afectar a la relación enzima-sustrato (Balny y Masson, 1993). Mozhaev y col. (1996) utilizan la alta presión para aumentar la actividad catalítica y la estabilidad térmica de la quimotripsina: a 20°C/470 MPa consiguen una actividad del enzima durante el tratamiento 6,5 veces superior a la actividad a presión atmosférica, y a 50°C/360 MPa la velocidad de reacción es 30 veces superior a la que se observa en condiciones normales (20°C, 0,1 MPa). También observan que a 55°C/180 MPa el enzima se mantiene activo, mientras que a presión atmosférica esta temperatura es responsable de su desnaturalización. A partir de 360 MPa la actividad enzimática disminuye

debido a que el enzima se desnaturaliza. En un estudio anterior, Heremans y Heremans (1989) observan un cambio conformacional responsable de la pérdida de actividad del enzima, si bien se produce a presiones inferiores, entre 100 y 300 MPa, dependiendo del pH del medio. Kunugi y Tanaka (1997) estudian los efectos de presiones inferiores a 100 MPa sobre distintas proteasas, observando que, en muchos casos aumenta la actividad de estos enzimas. A presiones a partir de los 300 MPa las proteasas pierden actividad debido a los cambios estructurales causados por la alta presión. La pepsina y la renina son completamente inactivadas a partir de 500-600 MPa (Mathews y col., 1940).

Seyderhelm y col. (1996) evalúan el efecto de la presurización sobre distintos enzimas en tampón fosfato. Su sensibilidad a la presión, en orden ascendente, es: lipooxigenasa, lactoperoxidasa, pectinesterasa, lipasa, fosfatasa, catalasa, polifenoloxidasas y peroxidasa. Un aumento moderado en la temperatura (45-60°C) aumenta la inactivación. Al tratar los mismos enzimas en alimentos observan un efecto baroprotector: la presencia de sacarosa protege a la pectinesterasa y la leche protege a la fosfatasa y a la lactoperoxidasa, mientras que la lipooxigenasa presenta la misma estabilidad en leche que en solución tampón.

1.8.3.1.2 Efectos sobre la transición sol-gel.

La alta presión induce la gelificación de numerosas soluciones de proteínas. Según Gekko (1992) y Mozhaev (1994), los efectos de la alta presión sobre la transición sol-gel de las proteínas y los polisacáridos se explican dependiendo de las distintas formas de hidratación que se producen en los estados de sol y gel. Se observa que, en muchos casos, al aumentar la presión se reduce la temperatura de transición sol-gel, de manera que se pueden producir geles a temperatura ambiente. La temperatura de fusión de geles de gelatina aumenta con la presión, mientras que geles de ovoalbúmina y proteína de soja formados por calor son desestabilizados al aumentar la presión. Dependiendo del mecanismo de gelificación que prevalezca en cada caso (si supone ΔV negativos o positivos) la alta presión los favorecerá o no. Por supuesto, factores como el pH y la temperatura modifican la capacidad inductora de la gelificación mostrada por la alta presión.

Las proteínas globulares están sujetas a la desnaturalización a bajas

temperaturas, la llamada desnaturalización en frío. La alta presión se ha utilizado para prevenir la congelación de las soluciones acuosas de proteínas para conseguir la formación de geles a temperaturas inferiores a los 0°C. Debido a que la alta presión *per se* afecta a la estabilidad de las proteínas, también juega un papel, que todavía está por determinar, en la desnaturalización en frío (Jonas, 1997). Ponce y col. (1996) obtienen geles a partir de huevo líquido aplicando tratamientos a 450 MPa/-15°C/30 min. Hayashi y col. (1997) estudian la desnaturalización del enzima carboxipeptidasa Y, que presenta la característica excepcional de conservar completamente su actividad aún hallándose a -30°C a presión atmosférica. Al tratar a 300 MPa a temperatura de congelación el enzima pierde irreversiblemente su actividad.

1.8.3.1.3 Sobre las propiedades funcionales.

La alta presión, aplicada al pH y temperatura adecuados, puede conseguir la desnaturalización parcial de las proteínas de modo que se mejoren sus propiedades emulsificantes (Denda y Hayashi 1992). Vermeuler y Heremans (1997) detectan que cuando la β -lactoglobulina actúa como estabilizante en emulsiones o/w presenta una estabilidad a la presión distinta de cuando se halla en solución.

1.8.4 Hidratos de carbono.

La alta presión tiene efecto sobre la transición sol-gel de los polisacáridos (Gekko, 1992 y Mozhaev, 1994), al igual que sucede con las proteínas. La temperatura de fusión de los geles de agarosa aumenta al aumentar la presión, mientras que los geles de carragenato se desestabilizan. Rubens y col. (1997) observan que la presurización hincha los gránulos de almidón, aunque sin alterar su estructura, a partir de 400-650 MPa, dependiendo del origen del almidón. Gustin y col. (1997) estudian la aplicación de la alta presión para la obtención de geles de pectina, observando que los geles obtenidos a partir de soluciones de pectina de bajo metoxilo son más estructuradas y elásticas y menos pegajosas que las obtenidas por tratamiento térmico, atribuyéndolo a una redistribución del calcio por toda la solución.

También se ha utilizado el tratamiento de alta presión para aumentar la susceptibilidad del almidón del arroz a la acción de la amilasa en la producción de sake, un procedimiento que tradicionalmente se consigue aumentando la temperatura del almidón (Miyama y col., 1992).

1.9 Efectos y aplicaciones de la alta presión en leche y queso.

1.9.1 Utilización de la alta presión para reducir la carga microbiana de la leche.

La utilidad de la alta presión para retrasar la acidificación de la leche fue señalada por Hite y sus colaboradores en 1897 (Johnston, 1995). Timson y Short (1965) comprueban que después de tratar la leche a 1000 MPa sobreviven un 0,05% de la población inicial de microorganismos, y los supervivientes son principalmente esporas bacterianas. Realizan tratamientos entre -20° y 35° C, pero a presiones tan elevadas el efecto de la temperatura de tratamiento carece de importancia.

Más recientemente, Styles y col. (1991) estudian la reducción de la población de *Listeria monocytogenes* inoculada en leche cruda y UHT. Con un tratamiento de 340 MPa/23°C/1 h consiguieron una reducción de 6 log UFC/g en leche cruda y de 5 log UFC/g en leche UHT. La reducción del mismo microorganismo inoculado en nata líquida UHT (35% de grasa) ha sido estudiada por Rafalli y col. (1994) consiguiendo una reducción de 4 log UFC/g con un tratamiento de 450 MPa/25°C/30 min.

Tonello y col. (1992) aplican la alta presión en la reducción de la microbiota aerobia mesófila y coliformes totales del calostro bovino, consiguiendo reducciones de 3 log UFC/g en el primer caso y de 6 log UFC/g en el segundo. Los tratamientos aplicados son 200 MPa/ 20°C/ 16 h y 200 MPa/ 20°C/ 4 h respectivamente.

Patterson y col. (1995b) estudian la reducción de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en leche UHT y tampón fosfato pH 7, observando que la leche ejerce un efecto protector frente a la inactivación por alta presión respecto al tampón fosfato.

Isaacs (1995) estudia la inactivación de *E. coli* inoculada en leche entera, consiguiendo una reducción de 6 unidades logarítmicas con un tratamiento de 400 MPa/40°C/15 min.

López-Fandiño y col. (1996) consiguen la reducción hasta el nivel de detección (10 UFC/ml) de la microbiota sicrótrofa de leche cruda con un tratamiento de 300 MPa/25°C/30 min ó 400 MPa/25°C/10 min, aunque no descartan que parte de estos microorganismos hayan sido dañados subletalmente y por ello no se hayan

detectado durante el recuento. La población de bacterias aerobias mesófilas disminuye 1 unidad logarítmica a 400 MPa/25°C/10 min, siendo el recuento inicial de 5 log UFC/ml. Aplicando tiempos de tratamiento más prolongados no consiguen una mayor inactivación. Observan que las colonias recuperadas de la leche sin tratar presentan diámetros superiores a 0,5 mm, mientras que las que crecen a partir de leche presurizada no superan esta medida. La reducción de la población de bacterias aerobias mesófilas conseguida por Yuanbin y col. (1997) aplicando un tratamiento de 430 MPa/20°C/10 min es superior a la conseguida por López-Fandiño y col. (1996) pues inactivan el 99,5% de la población inicial ($1,1 \times 10^3$ UFC/g). Rademacher y Kessler (1997) consiguen alargar la vida útil de la leche almacenada a 10°C a 10 días con los tratamientos de 400 Mpa/30 min o 500 Mpa/8 min. Sionneau y col. (1997) han desarrollado un equipo piloto continuo para tratar 200 l/h de leche a una presión de 380 MPa, consiguiendo reducir 3 unidades logarítmicas la microbiota aerobia de la leche con un tiempo de residencia de 5 min.

Gervilla y col. (1997 a, b y c) estudian la inactivación por alta presión de *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus* inoculados en leche de oveja. Los estudios referentes al efecto de la temperatura del medio sobre la resistencia al tratamiento de alta presión se han comentado ya en este capítulo. *P. fluorescens* es el más sensible de los microorganismos ensayados, consiguiéndose una reducción logarítmica de 6-7 unidades con un tratamiento de 300 MPa/25°C/10 min, mientras que *S. aureus* y *L. helveticus* se manifiestan como los más resistentes, pues no se consiguen reducciones superiores a 2 y 3 log UFC/g respectivamente tratando a 500 MPa/25°C/10 min.

Otra aplicación relacionada con los microorganismos de la leche es la propuesta por Tanaka y Hatanaka (1992 y 1993) para prevenir la acidificación del yogur después del envasado. Con tratamientos entre 200 y 300 MPa/20°C/10 min se evita la acidificación post-ensado a la vez que se mantiene la población de bacterias ácido-lácticas, mientras que a partir de los 300 MPa los recuentos de estos microorganismos disminuyen. La textura del yogur se mantiene independientemente de la presión aplicada.

1.9.2 Efectos sobre las proteínas de la leche.

Diversos investigadores han estudiado este grupo proteico desde los puntos de vista de integridad estructural, observación microscópica e influencia en la velocidad de coagulación de la leche, detectándose convergencia o disparidad de opinión según los casos. En los trabajos que se citan en este apartado se ha tratado la leche o bien soluciones de proteínas lácteas, no habiendo ninguno que trate la cuajada ya elaborada. Puesto que en la mayoría de ellos se ha utilizado leche de vaca, cuando no se indica lo contrario se sobreentiende que se trata de leche de esta especie.

1.9.2.1 Caseínas.

Payens y Heremans (1969) observan que la β -caseína sufre un proceso de depolimerización reversible entre 0.1 y 150 MPa, mientras que a partir de 150 MPa se observa un proceso reversible de reasociación.

Ohmiya y col. (1987) estudian el efecto de la alta presión sobre la coagulación de la leche, aplicando una presión máxima de 130 MPa a 35°C y durante distintos períodos de tiempo a leche a la que se había añadido renina. En ningún caso observan desnaturalización de las proteínas de la leche ni de la renina. A presiones por debajo de los 40 MPa observan que se acelera el proceso de coagulación pero que se retrasa a presiones entre 60 y 130 MPa. Lo atribuyen a un retraso en la fase secundaria de coagulación, que corresponde a la formación de agregados de micelas de caseína y que sería retrasada por la alta presión puesto que implica un ΔV positivo como resultado de la liberación del agua ligada alrededor de las partículas proteicas. Shibauchi y col. (1992) observan que los tiempos de coagulación de distintas leches tratadas por alta presión son inferiores a los de la leche cruda. Este efecto empieza a observarse a partir de 100 MPa y se estabiliza a 400 MPa. Los estudios de microscopía revelan que las micelas de caseína sufren un cambio conformacional, y pasan de ser esféricas a organizarse en grupos o cadenas de submicelas.

Johnston y col. (1992a y b) observan, además de una reducción del tamaño de la micela, que después del tratamiento de alta presión (entre 200 y 600 MPa/1-120 min) quedan expuestos un mayor número de grupos hidrofóbicos en las proteínas de la leche, y que los geles preparados a partir de leche tratada presentan una mejora importante en sus propiedades físicas. Sostienen que el aumento de exposición de

grupos hidrofóbicos no es suficiente para explicar el gran aumento que se produce en la rigidez y la fuerza en el punto de ruptura, ni la gran resistencia a la sinéresis de los geles de leche presurizada. Sugieren que los cambios iniciados por la alta presión se amplifican durante el proceso de desintegración y reagregación que conduce a la formación del gel, desembocando en una mejora estructural. La observación microscópica de un mayor número de cadenas en la red de los geles de leche presurizada apoya esta teoría (Johnston y col., 1993).

Desobry-Banon y col. (1994) observan que el tamaño medio de las micelas de caseína desciende a medida que la presión aumenta en la franja de 230 a 430 MPa. Schrader y col. (1995) y Hinrichs y col. (1996) también observan la disociación de las micelas de caseína en leche presurizada, pero estos últimos señalan que a presiones por encima de los 400 MPa se produce su asociación. Los trabajos de Gill y col. (1997a y b) indican un aumento del 10% del diámetro medio de la micela de caseína al tratar a 200 MPa/10 min, y una reducción de más del 50% al tratar a presiones entre 400 y 600 MPa. También destacan un aumento significativo de la cantidad de β -lactoglobulina asociada a la fracción micelar, debido a la interacción de grupos sulfhidrilo entre la β -lactoglobulina y la κ -caseína. El tiempo de coagulación con renina disminuye en los tratamientos a 200 MPa, mientras que a partir de esta presión aumenta, al contrario de lo descrito por Shibauchi y col. (1992). Sugieren que es debido a la unión de la β -lactoglobulina a la superficie de la micela, puesto que han observado que si se bloquean los grupos de unión antes del tratamiento se impide el aumento del tiempo de coagulación. Observan también que los geles formados por acción de la renina sobre leche tratada a 600 MPa retienen más agua que los formados a partir de leche sin tratar.

López-Fandiño y col. (1996) estudian la coagulación enzimática de la leche presurizada. Las leches presurizadas coagulan a pH más elevado y formando unos geles más rígidos y con menos sinéresis que los obtenidos a partir de leche sin tratar. Observan, al igual que Shibauchi y col. (1992) y Gill y col. (1997) un descenso en el tiempo de coagulación a medida que aumenta la presión hasta llegar a 200 MPa. Lo atribuyen a la disminución del tamaño de la micela y los cambios conformacionales que le acompañan. A partir de 200 y hasta llegar a 400 MPa, el tiempo de coagulación

vuelve a aumentar, adquiriendo valores similares a los de la leche cruda. En cuanto a la textura de los geles formados, encuentran un máximo en la firmeza de la cuajada al tratar la leche a 300 MPa durante 30 min. En un estudio posterior (1997) observan que a pesar que la fase enzimática de la coagulación es inhibida a presiones superiores a 200 MPa, el tiempo de coagulación de la leche presurizada no depende tanto de la hidrólisis de la κ -caseína sino más bien de la fase de agregación, que se ve favorecida al elevar la presión. Esta observación se contradice con la teoría de Ohmiya y col. (1987), si bien las experiencias no son exactamente comparables pues estos últimos trabajan a presiones inferiores. La reducción del tamaño micelar puede favorecer la agregación de la caseína puesto que implica un aumento del área superficial disponible para la interacción y la formación de enlaces. Por otro lado, (López-Fandiño y col., 1997) sugieren que la desnaturalización de la β -lactoglobulina, que se da a presiones superiores a 100 MPa, y su asociación con la κ -caseína a través de puentes disulfuro intermoleculares, puede enlentecer la reacción enzimática y también la agregación de las micelas, contrarrestando los efectos de la disminución del tamaño micelar y explicando la reducción de la velocidad de coagulación a 300-400 MPa. Ferragut y Needs (1997) estudian las propiedades reológicas de yogures preparados con leches presurizadas a 200, 400 y 600 MPa. A 200 MPa, los yogures presentan propiedades reológicas similares a los de leche no presurizada, mientras que a presiones más elevadas la desintegración de las micelas proporciona unos geles más estables, firmes y homogéneos.

1.9.2.2 Proteínas séricas.

La β -lactoglobulina es la proteína sérica más sensible a la acción de la alta presión. Diversos autores ((Hayashi y col., 1987; Okamoto y col., 1991; Nakamura y col., 1993) proponen la utilización de la alta presión combinada con la hidrólisis enzimática para la obtención de proteína sérica que tenga hidrolizada selectivamente la β -lactoglobulina con el fin de disminuir su alergenicidad.

Dumay y col. (1994) observan que la presencia de un 5% de sacarosa en una solución de β -lactoglobulina sometida a 450 MPa/25°C/15 min ejerce un efecto de protección frente a la desnaturalización, reduciendo el desdoblamiento de la proteína y mejorando la reversibilidad de la agregación en dímeros.

López-Fandiño y col. (1996) comprueban que la β -lactoglobulina se desnaturaliza a partir de 100 MPa, mientras que la α -lactoalbúmina y la seroalbúmina resisten presiones de hasta 400 MPa durante 60 min. Evaluando el rendimiento quesero, observan un aumento después de tratar la leche a 300-400 MPa, debido a la incorporación adicional de β -lactoglobulina y a la mayor retención de humedad.

Felipe y col. (1997a y b) estudian el efecto en proteínas séricas de leche de cabra: la β -lactoglobulina aparece totalmente desnaturalizada después de un tratamiento a 250 MPa/25°C/10 min, mientras que las inmunoglobulinas y la α -lactoalbúmina resisten presiones superiores (400-500 MPa). Tal como han observado otros investigadores (Furtenberger y col., 1995 y Galazka y Ledward, 1997) en proteína procedente de leche de vaca, también detectan la formación de agregados solubles de β -lactoglobulina que están estabilizados por puentes disulfuro formados a causa de la exposición de grupos sulfidrilo reactivos al desdoblarse la proteína.

Iametti y col. (1997) estudian las modificaciones que se producen a nivel molecular en la β -lactoglobulina después del tratamiento. Las modificaciones estructurales irreversibles empiezan a 600 MPa y son completas después de tratar a 900 MPa durante 2 min, por lo tanto, después de tratamientos más intensos que los citados anteriormente. A presiones moderadas se producen modificaciones reversibles que conducen a la disociación transitoria de los dímeros. Los monómeros aislados se modifican y, por encima de un umbral de presión, interactúan para formar agregados que se estabilizan por interacciones covalentes y no covalentes. Esta formación de polímeros estables impide la reversibilidad del proceso de desnaturalización. La probabilidad de interacción de los monómeros modificados es mayor cuanto mayor es la concentración de β -lactoglobulina, y a concentraciones bajas de proteína aumenta la probabilidad de que los monómeros reviertan a la forma nativa e incluso vuelvan a formarse dímeros. Tratamientos en solución tampón a presiones inferiores, 100 MPa/15°C/30 min, causan una exposición reversible de grupos sulfidrilo comparable a la de un tratamiento térmico de 75°C/5 min (Stapelfeldt y col., 1997). Furtenberger y col. (1997) ponen en evidencia que la mayoría de los enlaces S-S inducidos por la presión resultan de reacciones de intercambio -SH/S-S y no de la oxidación de los grupos -SH.

1.9.2.3 Propiedades funcionales.

Van Camp (1995) compara las propiedades reológicas de geles de concentrados de proteínas séricas inducidos por alta presión (400 MPa/20-30°C/30 min) y geles inducidos por calor (80°C/30 min). Sus resultados indican que en los geles obtenidos por alta presión se forman enlaces menos estables que los que se forman por calor. La observación microscópica pone de manifiesto una estructura más porosa y con un menor número de puntos de contacto en los geles obtenidos por alta presión. En un estudio más reciente (1997) pone de manifiesto que en la estabilización de los geles inducidos por presión intervienen puentes disulfuro e interacciones electrostáticas. La formación de enlaces estables tanto a corto como a largo plazo depende de la concentración de proteína, es decir, de los puntos de contacto disponibles en la cadena polipeptídica. En todos los casos los geles formados por calor presentan un mayor número de enlaces.

Johnston y col. (1997) señalan que las mejoras causadas por un tratamiento a 400 MPa/30 min en la estabilidad de las espumas formadas a partir de concentrados de proteínas séricas respecto a las que se obtienen con un tratamiento térmico moderado (50-65°C/30 min), son debidas a un aumento de los puentes disulfuro inter e intramoleculares.

Galazka y col. (1996) observan la pérdida de capacidad emulsionante de la β -lactoglobulina por encima de los 200 MPa, debido a la agregación que sigue a la exposición de los grupos hidrofóbicos. La aplicación de alta presión sobre emulsiones preparadas a partir de proteína nativa tiene menos efecto sobre su estabilidad, puesto que las moléculas ya están interaccionando fuertemente con las moléculas vecinas y su conformación es menos susceptible a la alta presión. En un trabajo posterior (1997) estudian las espumas elaboradas a partir de soluciones de β -lactoglobulina presurizadas, observando el máximo de estabilidad a 350 MPa/20 min. La mejora en la estabilidad es atribuida a un aumento de la hidrofobicidad en la superficie de la proteína. Las leches presurizadas a 200 MPa también mejoran sus propiedades funcionales de cara a la formación de espumas (Adapa, 1996).

Pittia y col. (1997) observan que un tratamiento a 300-600 MPa/10 min mejora

la estabilidad de las espumas formadas a partir de β -caseína y β -lactoglobulina. La alta presión no afecta a la capacidad emulsificante de la β -caseína pero disminuye la de la β -lactoglobulina. Dickinson y James (1997) observan el mismo comportamiento utilizando tratamientos hasta 800 MPa/25°C/120 min.

1.9.2.4 Enzimas.

La inactivación de los enzimas presentes en la leche también ha sido objeto de estudio por parte de varios autores. Sus resultados se exponen en la Tabla I.3.

Tabla I.3 Resistencia a la alta presión de algunos enzimas de la leche.

Enzima	Tratamiento ⁽¹⁾	Inactivación	Referencia
Fosfatasa alcalina	600 MPa/20 min	60%	Johnston y col.,1995
	800 MPa/20 min	total	Johnston y col.,1995
	400 MPa/25°C/60 min	nula	López-Fandiño y col.,1996
	600 MPa/55°C/30 min	10%	Seyderhelm y col.,1996
	500 MPa/50° C/10 min ⁽²⁾	nula	Felipe y col.,1997
	800 MPa/20°C/8 min	total	Rademacher y col.,1997
Lactoperoxidasa	400 MPa/25° C/60 min	nula	López-Fandiño y col.,1996
	600 MPa/45° C/30 min	16%	Seyderhelm y col.,1996
Plasmina	500 MPa/50° C/15 min	nula	Trujillo y col., 1997

(1) Se reflejan los tratamientos a presiones, temperaturas y tiempos más elevados. (2) Leche de cabra.

1.9.3 Sobre los restantes componentes de la leche.

Los pocos estudios realizados hasta el momento del efecto de la alta presión sobre la grasa láctea han sido ya citados en el apartado I.1.8.2.

López-Fandiño y col. (1996) no detectan aparición de lactulosa, producto de isomerización de la lactosa que aparece después del tratamiento térmico, en leche presurizada.

No se han encontrado estudios acerca del comportamiento de las vitaminas de la leche sometida al tratamiento de alta presión.

El efecto sobre el equilibrio mineral ha sido abordado por varios

investigadores. Johnston y col. (1992b) no detectan ningún cambio en el pH ni en la concentración de calcio iónico después de someter leche desnatada un tratamiento de 600 MPa/25°C/60 min. Por otro lado, Shibauchi y col. (1992) observan que un tratamiento a 400 MPa/5 min libera el 40,7% del calcio ligado a las micelas, lo que conlleva un aumento del calcio iónico y la solubilización de parte de las micelas. Desobry-Banon y col. (1994) también relacionan la desintegración de las micelas de caseína con el aumento de los niveles de calcio y fósforo solubles. Lee y col. (1996) también observan el efecto desintegrador de la alta presión sobre suspensiones de caseinato cálcico. Más recientemente, Schrader y Buchheim (1997) estudian los cambios inducidos por la alta presión (400-500 MPa/20-40°C/5-20 min) en la distribución del fosfato cálcico de leche cruda y leche UHT, concluyendo que, aparentemente, se dan tres procesos a la vez durante el tratamiento de alta presión: a) en la leche UHT se produce una disociación del fosfato cálcico insoluble formado por acción del tratamiento UHT, que deriva en un ligero aumento reversible del pH; b) en los dos tipos de leche se produce una disociación parcial del fosfato cálcico micelar o coloidal, lo que produce un ligero aumento del pH y en la desintegración de las micelas de caseína y de los agregados de caseína y proteína sérica, que también es reversible. Estas disociaciones son completas al cabo de 10 min de tratamiento; c) en la leche que contiene proteína sérica nativa se produce su desnaturalización.

1.9.4 Aplicación de la alta presión en quesos.

Una de las primeras aplicaciones de la alta presión en quesos ha consistido en su uso para la aceleración de la maduración. Una patente de EEUU (Yokohama y col., 1993) propone la utilización de presiones continuas entre 10-250 MPa a 25°C para reducir el tiempo de maduración de 6 meses a tres días. Los tratamientos se aplican a cubos de 10 cm³ de queso Cheddar, envasados al vacío, a los que se inoculan 10⁷ UFC de *Lactobacillus*/g y enzimas. Con el mismo objetivo, Jin y Harper (1996) estudian las relaciones entre el tratamiento de alta presión, la inactivación de microorganismos y el desarrollo de aroma en la maduración acelerada de pastas de queso suizo. Las presiones utilizadas por estos autores se hallan en un intervalo de 350-550 MPa durante 10 - 30 minutos.

Messens y Huyghebaert (1996) utilizan la alta presión para acelerar el salado en queso tipo Gouda. Las presiones utilizadas en el estudio están entre 100-400 MPa, y los

tiempos entre 0,5 y 4 horas. Observan que a medida que aumenta la presión la incorporación de sal al queso es más rápida. El salado a presiones superiores a los 200 MPa provoca un aumento significativo del pH respecto a los quesos salados a presión atmosférica pero a medida que avanza la maduración la diferencia se reduce, hasta llegar a ser nula. Analizando la fase acuosa del queso (exudado del queso, extraído por compresión) observan un aumento en su extracto seco, mayoritariamente debido a un aumento del contenido en nitrógeno total (Messens y Huyghebaert, 1997).

Otra aplicación de la alta presión en quesos ha sido señalada por Torres-Mora y col. (1996) quienes sugieren que los tratamientos a alta presión pueden ayudar a reducir la gran variabilidad del contenido en humedad existente en un mismo bloque de queso o entre distintos bloques, y pueden generarse nuevas texturas.

Szczawinski y col.(1996) muestran la utilidad de la alta presión para reducir poblaciones elevadas de *Listeria monocytogenes* inoculada en queso madurado loncheado. Reys y col. (1997) estudian el efecto de presiones entre 50 y 1000 MPa, en tratamientos cíclicos y continuos sobre los microorganismos y enzimas de quesos en distintos estadios de maduración. Sus resultados indican que la inactivación de los microorganismos aumenta con la presión, exceptuando la inactivación de las esporas; los tratamientos cíclicos aumentan la reducción de las poblaciones microbianas; la inactivación de las proteasas se produce a presiones superiores a 800 MPa; la alta presión produce un efecto favorable en las propiedades organolépticas del queso, sobretodo en su consistencia.

Trujillo (1996) revela la utilidad de la alta presión para la obtención de cuajadas modelo sin flora láctica ni enzimas coagulantes para estudiar la proteólisis del queso debida a la plasmina. El tratamiento a 400 MPa/2°C/10min de cuajadas saladas y envasadas al vacío produce quesos con unos niveles muy bajos de microorganismos y no modifica la actividad de la plasmina, de manera que se puede evaluar la proteólisis debida a la acción de este enzima.

2. EL QUESO *MATÓ*.

El *Mató* se sitúa dentro de la categoría de quesos frescos. Según Orden 29/11/85, BOE núm. 295, el queso fresco es aquél que está dispuesto para su consumo al finalizar el proceso de elaboración. En España existe una gran variedad de ellos (Canut y Navarro, 1990): los quesos de Burgos y Villalón, tradicionalmente elaborados con leche de oveja en las zonas de origen, actualmente han extendido su fabricación y comercialización por todo el Estado y se fabrican con leche de vaca principalmente. En Cantabria y Asturias predominan las mezclas de vaca y oveja en los quesos de *Pido*, *Porrúa* y *Quesucos*. En el resto del Estado la mayoría de quesos frescos se elaboran con leche de cabra y cuando son de amplia comercialización se incorpora leche de vaca, que pasa a ser predominante. Son ejemplos de ello los quesos de *Cádiz*, *Alicante*, *La Nucía*, *Cameros*, *Herreño*, *Málaga*, *Murcia*, *Tenerife*, *de la Vera* o *el Mató*. Los quesos *Servilleta* y *Puçol* o *Cassoleta*, elaborados en Valencia y Alicante, originariamente eran de leche de oveja y actualmente también incorporan leches de vaca y cabra. Algunos de ellos se consumen exclusivamente como frescos y otros, opcionalmente, pueden someterse a un proceso de maduración y consumirse tiernos. En la mayoría de los casos no se prensan y la cuajada se exprime o compacta manualmente cuando se introduce en los moldes. Cuando se prensan, el prensado es suave durante largo tiempo, o bien intenso durante corto tiempo. Tradicionalmente, el único de ellos que se elaboraba sin adición de sal era el *Mató*. Actualmente se elaboran quesos frescos sin sal para responder a las necesidades dietéticas de los consumidores.

2.1 Proceso de elaboración.

El *Mató* es un queso fresco sin sal que se elabora en Cataluña. Originariamente se elaboraba en zonas rurales a partir de leche cabra, sobretodo durante la primavera y el otoño, y en verano si sobraba leche de la venta directa en las poblaciones. Era un producto destinado al autoconsumo o bien a la venta en el mercado semanal. La leche se hervía y se le añadía cuajo vegetal, si bien en algunos lugares se utilizaba limón o vinagre. La coagulación tenía lugar aproximadamente a 40°C. Se hacía un corte en forma de cruz a la cuajada y se dejaba reposar, separando el suero por decantación. La masa se colocaba en un paño sobre un escurridor durante unos quince minutos y después se ataba el paño por las cuatro puntas y se colgaba, como mínimo tres horas y como máximo una noche, cerca del fuego, para que no se

enfriara demasiado y escurriera bien (Canut y Navarro, 1980).

Actualmente debemos definirlo como un queso sin salar elaborado a partir de leche de cabra, de vaca o de su mezcla. La leche recibe un tratamiento de pasterización alta y se le añade CaCl_2 y cuajo, de procedencia animal en la mayoría de los casos. La temperatura de coagulación varía entre 30 y 40°C, dependiendo del fabricante. Se obtiene una cuajada compacta al cabo de 30-40 min que se corta ligeramente con un cuchillo o con una lira de separación ancha. Se desuera por decantación y se deposita con cuidado en moldes bajos y cilíndricos cubiertos por gasas para que escurra por su propio peso durante un mínimo de 3 horas y un máximo de 12. Después se refrigera, quedando listo para consumir. Habitualmente se presenta al consumidor envasado en piezas con un peso entre 250-400 g. También se encuentra envasado en porciones individuales, sobretodo en quesos que se distribuyen a restaurantes, pues es frecuente su consumo como postre acompañado de miel.

Sus características organolépticas lo definen como un queso de corte cerrado y continuo, de textura blanda y gelatinosa, graso y húmedo al paladar. De color blanco intenso y brillante. Su sabor es fresco, dulzón y lechoso. Actualmente se fabrica durante todo el año en instalaciones artesanales, semi-industriales e industriales. Los únicos datos sobre el volumen de producción en Cataluña son del año 1984 e indican unas 700-800 t/anales frente a las 100 Tn/año de otros quesos frescos y 600-700 t/año de *recuit* (cuajada) (Canut, 1984 y Canut y Navarro, 1990).

La principal característica diferencial respecto al resto de los quesos frescos es el tratamiento de pasterización elevada, que recibe con la finalidad de desnaturalizar las proteínas séricas e incorporarlas a la cuajada, aumentando así el rendimiento. No disponemos de información precisa sobre el tratamiento térmico a que se somete la leche. Los pocos datos que se conocen indican temperaturas entre 85 y 90°C.

También son escasos los datos acerca de las características físico-químicas de este queso. Se exponen a continuación en la Tabla I.4, junto con los de otros quesos frescos de cabra y oveja.

Tabla I.4. Características físico-químicas de distintos quesos frescos.

	<i>Mató</i> ¹	Fresco ²	Fresco ³	Fresco ⁴	Cameros ⁵	Burgos ⁶
ES*	31,87	43,9	41-44	43-48,4	56,5	15-46
Cenizas*	1,39	-	2,2-3	3-3,8	-	-
MG*	18,01	21,73	20-22	20-25	24,9	9-31
NT*	1,86	2,53	2,3-2,7	2,3-3,1	2,35	-
NS/NT*	33,79	11	13,1-16,8	11,5-19,5	-	-
NNP/NT*	10,63	2,44	1,8-2,5	4,2-8	2,8	-
NaCl*	0,03	-	0,6-0,8	1,2-1,9	0,9	0,3-2,1
pH	6,33	6,79	6,3-6,8	5,3-6,36	6,1	5-6,7
A _w	-	-	-	0,972-0,992	-	0,981-0,999

* %; ¹Canut y Navarro (1980), n=1; ²Juárez y col. (1993); ³Martín-Hernández (1988), n=12; ⁴Marcos y col. (1985), n=6; ⁵Olarte y col. (1995), n=12; ⁶García y col.(1987), n=36.

2.2 Conservación del *Mató*.

Durante la elaboración del *Mató* no se produce adición alguna de cultivos lácticos ni de sal, por lo que presenta valores de pH y A_w muy favorables al crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, debe conservarse refrigerado y aún así su consumo queda restringido a 6-8 días después de su fabricación. El factor determinante de su corta vida es la contaminación aportada durante la elaboración, en la que deberían contemplarse unas estrictas condiciones higiénicas, que no siempre se tienen en cuenta a la vista de los resultados que se exponen en la Tabla I.5, que corresponden a análisis microbiológicos llevados a cabo por distintos autores en *Mató* y otros quesos frescos.

Tabla I.5 Recuentos microbianos (Log UFC/g) de distintos quesos frescos.

	<i>Mató</i> ¹	<i>Mató</i> ²	Fresco ³	Fresco past. ⁴	Burgos ⁵	Burgos ⁶
Aerob. mesófilos	6.62	6.66	-	-	5.8-9.93	7.34
Enterobacterias	5.91	5.21	4-8	4->6	-	-
Coliformes	3.84	4.45	-	-	4.6-9.05	5.01
<i>E. coli</i>	3.79	4.55	7	>3	-	-
<i>S. aureus</i>	0.95	0.3/aus	*	aus	1.7-7.2	5.83
<i>Salmonella/ Shig.</i>	aus	aus	aus	aus	-	-

* Presencia en alguna de las muestras; aus: ausencia en todas las muestras; -: no analizado.

¹Marín y col. (1995), media de las producciones de una fábrica artesanal durante ocho meses; ²Marín y col. (1995), media de cinco marcas comerciales, ³Moro y col. (1990), media de 350 muestras de quesos frescos procedentes de pequeñas industrias; ⁴Ubach y col. (1991), media de 85 muestras de quesos frescos pasterizados y 6 requesones adquiridos en el comercio minorista; ⁵García y col. (1987), media de 36 muestras de queso de Burgos adquiridas en el comercio minorista; ⁶Chavarrí y col. (1985), media de 94 muestras de queso de Burgos recogidas del comercio minorista.

En algunos casos se trata de recuentos muy elevados, y la mayoría exceden lo establecido en los criterios microbiológicos aplicables al queso fresco (Real Decreto 1679/1994), que detallamos en la Tabla I. 6:

Tabla I.6 Criterios microbiológicos aplicables al queso fresco (R. D. 1679/1994):

	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	0	ausencia	ausencia
<i>Salmonella</i> spp./25 g	5	0	ausencia	ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i> /g	5	2	10	100
<i>Escherichia coli</i> /g	5	2	100	1000

n=número de unidades de muestras de un lote que se analizan según el programa de muestreo establecido.

c=número de muestras que pueden rebasar el límite *m* sin ser superior al límite *M*.

m=límite microbiológico que únicamente *c* de las *n* muestras pueden sobrepasar (UFC/g).

M=nivel límite de aceptabilidad. Los valores superiores a *M* no son aceptables (UFC/g).

Listeria monocytogenes y *Salmonella* spp. se incluyen en los criterios obligatorios, que hacen referencia a microorganismos patógenos. El primero de ellos no estaba contemplado en la anterior Norma de Calidad para queso fresco (Orden 26/11/1985) pero se ha incluido en esta nueva legislación, pues los quesos han sido en muchas ocasiones los transmisores de infecciones causadas por este microorganismo (Farber, 1989; Johnson y col., 1990).

Staphylococcus aureus y *Escherichia coli* se contemplan dentro de los criterios analíticos (microorganismos testigos de falta de higiene) si bien el Real Decreto especifica que la detección de cepas de *S. aureus* enterotoxígenos o de cepas de *E. coli* patógenas implicará la retirada del mercado de todos los lotes del producto.

Para la prevención del crecimiento de bacterias patógenas y causantes de alteraciones en los quesos frescos, se han utilizado y propuesto distintos procedimientos, como la inoculación de cultivos lácticos en el queso de Burgos (Núñez y col., 1986), el envasado en atmósferas modificadas (Maniar y col., 1994; Sendra y col., 1994), la pasterización superficial (Rosenthal y col., 1996) o la activación del sistema lactoperoxidasa durante la elaboración (Santos y col., 1995). La adición de conservantes (ácido sórbico y sus sales, mayoritariamente) es una práctica habitual que consigue alargar la vida de este tipo de producto hasta 15-21 días. La utilización de nisina es otra de las alternativas propuestas para mejorar la calidad microbiológica del queso.

3. UTILIZACION DE LA NISINA COMO CONSERVANTE.

La nisina es una sustancia antimicrobiana producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis*. En la Unión Europea está autorizada en quesos fundidos y

madurados, en una dosis máxima de 12,5 ppm. Su aplicación en otros alimentos es objeto de estudio por parte de diversos grupos de investigación a nivel internacional.

Existen numerosos estudios y revisiones que analizan aspectos referidos a la nisina, probablemente la bacteriocina más estudiada de las producidas por microorganismos lácteos (Mattick y Hirsch, 1947; Hurst, 1981; Anon. 1988 a, b, c, d y e; Delves-Broughton, 1990 a y b; Oscroft, 1990; Stevens y col., 1991; Kalchayanad y col, 1992; Ray, 1992; Maisnier-Patin y col., 1995; Montville y col., 1995; Dean y Zottola, 1996 y Rodríguez, 1996;). Las principales características de la nisina, detalladas en las revisiones mencionadas, son las siguientes:

- la nisina es un péptido de 34 aminoácidos del que existen seis variantes naturales conocidas: A, B, C, D, E y Z. No todas las variantes presentan la misma actividad antibacteriana. Puede encontrarse formando dímeros y tetrameros,
- la molécula es de naturaleza ácida y estable en condiciones ácidas: a pH 2 es estable a un tratamiento de 121°C durante 15 minutos, pero a pH 5 y 6.8 pierde un 40% y un 90% de su actividad. Se destruye completamente a pH 11 con un tratamiento de 63°C/30 min. A pH 2,5 es estable durante mucho tiempo, sobretodo en refrigeración. En alimentos con pH 5-6,5 todavía conserva efecto antibacteriano, aunque es menor que a pH 4 o inferiores,
- la molécula de nisina es de naturaleza hidrofóbica. Es soluble en medio acuoso (4% a pH 5), si bien a pH alcalino su solubilidad es casi nula,
- la nisina no es tóxica, es inactivada por la acción enzimática digestiva y no produce reacciones de sensibilización ni de aparición de resistencias cruzadas en microorganismos que puedan afectar al uso terapéutico de otros antibióticos,
- la nisina ejerce su acción antibacteriana frente a varios microorganismos gram positivos y esporas. Dentro de una misma especie sensible a la nisina aparecen cepas que muestran resistencia o diferencias en la sensibilidad, e incluso en una cepa sensible existen células que muestran resistencia. Es activa frente a especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Listeria*. Tanto las células vegetativas como las esporas de *Bacillus* y *Clostridium* son sensibles a su acción. Los microorganismos gram negativos y los gram positivos resistentes pueden desarrollar sensibilidad a la

nisina cuando son sometidos a tratamientos subletales (congelación, calor, ácidos, alta presión) que causan lesiones en la membrana celular.

- la nisina es bactericida para las células vegetativas que muestran sensibilidad: se absorbe a la superficie celular y actúa desestabilizando la membrana citoplasmática mediante la formación de poros; se produce vertido de material citoplasmático y, en algunos casos lisis celular,
- la acción frente a las esporas se considera esporostática, puesto que, una vez iniciada la germinación, inhibe la fase de hinchamiento previa al desprendimiento de la cubierta y la salida de la célula vegetativa. El mecanismo de inhibición se basa en la modificación de los grupos sulfidrilo de la cubierta de las esporas que han iniciado la germinación. Como ocurre en las células vegetativas, la sensibilidad a la nisina varía entre géneros y también dentro de una misma especie. Los tratamientos térmicos aumentan la sensibilidad de las esporas a la acción de la nisina.

La mayoría de estudios realizados en alimentos han utilizado Nisaplin®, un preparado comercial que se obtiene a partir de la fermentación por parte de *Lactococcus lactis* de un medio lácteo sin grasa. La nisina producida se concentra, separa, seca y muele hasta obtener pequeñas partículas, que se estandarizan con la adición de NaCl. Un gramo de Nisaplin® contiene 10^6 UI de nisina (500 UI de nisina/gramo de alimento corresponden a 12,5 ppm). Cuando la nisina se añade a los alimentos hay que tener en cuenta una serie de factores que pueden afectar a su eficacia:

- la nisina es más eficaz en alimentos líquidos que en alimentos sólidos,
- la cantidad y la distribución de la grasa del alimento interfieren en su correcta dispersión, ya que al ser una molécula de características hidrofóbicas es atraída hacia los componentes lipídicos,
- si el alimento es sometido a un tratamiento térmico hay que tener en cuenta que se inactiva parte de la nisina dosificada inicialmente. Durante el almacenamiento, incluso a temperaturas de refrigeración, también se observan pérdidas de actividad.

La nisina fue autorizada como conservante en 1969 por el Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/WHO (Anon., 1969) y en 1988 fue

declarada sustancia GRAS por la Food and Drug Administration (FDA) para su utilización en queso y productos de queso procesado. La FDA ha recibido peticiones para extender la declaración de la nisina como sustancia GRAS a otros alimentos (Fields, 1996).

La utilización de nisina en queso inicialmente iba dirigida a evitar la proliferación de microorganismos esporulados. Con este fin se añade también en algunos países a leches y batidos esterilizados y a postres lácteos. En los últimos años, se ha comprobado su eficacia contra *Listeria monocytogenes* y se ha propuesto su utilización en leche, queso y helado para inhibir este microorganismo.

Diversos autores señalan que la utilización de nisina y de bacteriocinas en general jugará un papel importante en el futuro en la conservación de alimentos aunque no como sistema único, sino combinado con otras bacteriocinas o con otras técnicas de conservación (Hanlin, 1993; Gould, 1996 y Richard, 1996). Mor-Mur y col. (1997) han utilizado con éxito la alta presión combinada con la adición de 100-200 ppm de nisina para inactivar microorganismos inoculados en carne de pollo y huevo líquido.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

1. OBJETIVOS.

En este estudio se pretende valorar la eficacia e idoneidad de la alta presión hidrostática como tratamiento de conservación del *Mató*.

Para evaluar la eficacia de la alta presión como tratamiento conservador se han fijado las siguientes tareas:

- establecer cuáles son los tratamientos que consiguen niveles suficientes de inactivación de las poblaciones inoculadas.
- estudiar la inactivación de la microbiota propia del queso y la de poblaciones habitualmente contaminantes, que presenten distintas resistencias a la presión, inoculadas en el queso.
- estudiar el efecto combinado del tratamiento de alta presión con la adición de nisina.
- seguir la evolución de los microorganismos presentes en el queso después del tratamiento.

Para valorar la aplicabilidad del tratamiento y la calidad organoléptica del queso se evalúan las siguientes características físico-químicas del *Mató* en aquellas condiciones que garanticen reducciones suficientes de las poblaciones inoculadas:

- variaciones de composición en los quesos tratados
- variaciones en el desuerado
- cambios en la microestructura
- cambios en la textura y el color de los quesos, evaluados por métodos instrumentales
- apreciación sensorial de las diferencias entre quesos presurizados y no presurizados

El plan de trabajo que se ha seguido se detalla a continuación.

2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.

Los microorganismos seleccionados para las experiencias de inactivación fueron:

-*Escherichia coli* 405 CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Se seleccionó una cepa no patógena de *E. coli* por ser un microorganismo del grupo de los coliformes, utilizados como indicadores de contaminación fecal y porque sus recuentos máximos están establecidos en el Real Decreto 1697/1994 que detalla los criterios microbiológicos para el queso fresco.

-*Staphylococcus carnosus* 4491 CECT. Se seleccionó por pertenecer al mismo género que *S. aureus*, contaminante habitual en quesos frescos y contemplado en el mencionado Real Decreto. Se trata de un género identificado como resistente a la alta presión y la ventaja que nos ofrecía esta especie es que no es patógena y existen datos publicados acerca de su respuesta al tratamiento de alta presión.

-suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* (Merck). Se escogió el producto en forma de suspensión por la comodidad de su utilización, que permite estandarizar los inóculos. *B. subtilis* es una especie que puede encontrarse en la leche y sus derivados y ha sido utilizada en otros estudios con alta presión. La cepa suministrada por Merck corresponde a la cepa 482 CECT.

En el presente apartado se va detallando, a medida que aparece, la nomenclatura de las muestras que después se utiliza en el resto del trabajo. Al final del capítulo se incluye un resumen en forma de tabla de las experiencias realizadas con microorganismos.

2.1 *Escherichia coli*.

Se ensayaron las combinaciones posibles con los siguientes niveles de las variables mencionadas a continuación:

PRESIÓN: 400, 450, 500 MPa

TEMPERATURA: 2, 10, 25°C

TIEMPO: 5, 10, 15 min

Después de la elaboración, las muestras fueron enfriadas o calentadas hasta alcanzar la temperatura de tratamiento antes de ser introducidas en el equipo de alta

presión.

Cada tratamiento se realizó sobre cuatro muestras de queso elaborado con leche inoculada, con lo que se obtuvieron *quesos de leche inoculada presurizados* (QLIP), que se utilizaron para los análisis microbiológicos los días 1, 15, 30 y 60 después del tratamiento. Este protocolo se repitió tres veces, con lo que se obtuvieron tres muestras de queso tratadas independientemente para cada día de análisis.

Se conservaron 12 muestras *de queso de leche inoculada sin presurizar* (QLI) de cada producción en refrigeración (4°C), que fueron analizadas por triplicado los días 1, 15, 30 y 60 después de la elaboración.

En cada producción se elaboraron quesos a partir de leche pasteurizada no inoculada (LP), o *queso control* (QC), que nos permitieron, por un lado, comprobar que durante el proceso de elaboración no se habían incorporado *E. coli* o microorganismos que pudieran crecer en el mismo medio de cultivo y por otro lado, conocer los recuentos iniciales de bacterias aerobias mesófilas. Se analizaron tres muestras de QC de cada producción.

Parte de los QC se sometieron a los mismos tratamientos que los QLIP, con lo que se obtuvieron *quesos control presurizados* (QCP), que una vez analizados nos permitieron comprobar la reducción debida al tratamiento en la población de bacterias aerobias mesófilas. Se analizó una muestra de QCP para cada tratamiento.

Los análisis microbiológicos se realizaron un día después del tratamiento de alta presión. Hasta el momento del análisis las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Para determinar si la inactivación bacteriana era total o habían quedado células dañadas que no podían crecer en VRBA se incubaron a 37°C/18 h muestras de queso escogidas al azar de distintos tratamientos. Después de la incubación se sembraron diluciones de las muestras en VRBA para determinar la presencia de *E. coli*.

2.2 *Staphylococcus carnosus*.

Teniendo en cuenta los resultados de las experiencias con *E. coli* se fijaron los

tratamientos para las primeras experiencias con *S. carnosus*.

En estas experiencias y en las siguientes con otros microorganismos, los tratamientos se realizaron al día siguiente de la elaboración. Los quesos se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 18 h. Antes del tratamiento fueron enfriadas o calentadas hasta alcanzar la temperatura adecuada. Los análisis microbiológicos se realizaron al día siguiente del tratamiento.

Cada tratamiento se repitió dos veces, con lo que se obtuvieron dos muestras de QLIP. Se analizaron dos muestras de QLI de cada producción.

En cada producción se elaboraron quesos a partir de leche no inoculada, o *queso control* (QC), que nos permitieron, por un lado, comprobar que durante el proceso de elaboración no se habían incorporado *S. carnosus* o microorganismos relacionados que pudieran crecer en el mismo medio de cultivo y por otro lado, conocer los recuentos iniciales de bacterias aerobias mesófilas. Se analizaron dos muestras de QC de cada producción.

Los tratamientos realizados en las experiencias con *S. carnosus* fueron los siguientes:

2.2.1 Tratamientos a 10°C.

Se aplicaron los tratamientos derivados de la combinación de las siguientes variables:

PRESIÓN: 400, 450, 500 MPa

TIEMPO: 5, 10, 15 min

que se completaron con el tratamiento a 500 MPa/30 min.

Algunas de estas combinaciones se aplicaron en muestras de queso inmediatamente después de finalizar el proceso de elaboración y 18 horas después para valorar el efecto del tiempo transcurrido desde la elaboración sobre la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento.

2.2.2 Tratamientos a 25°C.

PRESION: 500 MPa

TIEMPO: 15, 30, 45, 60 y 75 min

2.2.3 Tratamientos a 50°C.

PRESION: 500 MPa

TIEMPO: 15, 30, 45, 60 y 75 min

Se realizó una segunda experiencia a 50°C con el fin de disminuir el nivel de detección del método de análisis e incorporar los tratamientos a:

500 MPa/5 min

500 MPa/10 min

500 MPa/10 min/ temperatura cilindro:50°C/ temperatura muestra: 15°C

500 MPa/15 min/ temperatura cilindro: 50°C/ temperatura muestra: 15°C

Se sondó una muestra de queso para conocer la temperatura real de tratamiento en las muestras que no habían sido previamente atemperadas antes de introducirse en el cilindro.

Se incubó una muestra de cada tratamiento a 37°C/24 h después de presurizar.

2.2.4 Tratamientos con nisina.

Los quesos elaborados a partir de leche inoculada con *S. carnosus* y con nisina añadida fueron tratados a:

PRESION: 500 MPa

TEMPERATURA: 10, 25°C

TIEMPO: 5, 15, 30 min

Una parte de los quesos se mantuvo en refrigeración y se analizó 1 y 30 días después de la elaboración y otra parte se conservó a 25°C para seguir su evolución hasta los 15 días después del tratamiento.

Se realizó una segunda producción con una dosis de nisina inferior que permitiera observar el posible efecto aditivo de la nisina y alta presión.

2.2.5 Tratamientos en ciclos.

Se realizó una experiencia preliminar a 10°C y se complementó con una segunda experiencia en las mismas condiciones, que permitió compararlos con tratamientos continuos de la misma duración y seguir la evolución de los recuentos durante un mes de conservación en refrigeración. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

PRESION: 500 MPa

TIEMPO: 15 y 30 min

ciclos de 1 x 5, 2 x 5, 3 x 5, 4 x 5, 5 x 5 y 6 x 5 min

2.3 Esporas de *Bacillus subtilis*.

Se realizaron tres producciones con distintos tratamientos dirigidos a provocar la germinación y la posterior inactivación de las esporas inoculadas. Los tratamientos se seleccionaron a partir de los datos hallados en la bibliografía. Los análisis bacteriológicos se realizaron por triplicado. Los tratamientos aplicados fueron:

60 MPa/210 min/40°C seguido de 500 MPa/15 min/40°C

60 MPa/210 min/40°C seguido de 500 MPa/15 min/25°C

60 MPa/210 min/30°C seguido de 500 MPa/15 min/25°C

60 MPa/210 min/25°C seguido de 500 MPa/15 min/25°C

La primera parte del tratamiento, a 60 MPa, corresponde al tratamiento para provocar la germinación de las esporas. La segunda parte, a 500 MPa, corresponde al tratamiento para inactivar las células vegetativas.

2.4 Experiencias en quesos con nisina y no inoculados.

Estos tratamientos se realizaron para valorar el efecto de la nisina combinada con la alta presión sobre la población de microorganismos aerobios mesófilos propia del queso y sobre su evolución. Las muestras tratadas y los controles se analizaron por duplicado.

Se aplicaron los siguientes tratamientos a 25°C:

400 MPa/5 min

500 MPa/5 min, 2 x 5 min y 3 x 5 min

Se realizó una segunda producción en quesos sin inocular y con nisina en la que se aplicaron los siguientes tratamientos a 25°C:

500 MPa/5, 30 min

Estos quesos se conservaron en refrigeración para seguir la evolución de la población de microorganismos aerobios mesófilos y de esporas hasta 4 meses después de la elaboración.

3. ASPECTOS FISICO-QUIMICOS.

3.1 Experiencias preliminares para valorar el desuerado.

Se utilizaron las muestras tratadas a 2 y 10°C de las experiencias con quesos elaborados a partir de leche inoculada con *Escherichia coli*. Las mismas muestras del análisis microbiológico se utilizaron para valorar el desuerado en los QC y QLIP, así como para seguir su evolución cada quince días durante dos meses. Los análisis se realizaron por triplicado en cada tratamiento.

3.2 Experiencias para el análisis de las características físico-químicas

Se realizaron seis producciones identificadas como P1 a P6. Los tratamientos efectuados fueron:

PRESION:	500 MPa
TEMPERATURA:	P1 y P2.....10°C
	P3 y P4.....25°C
	P5 y P6.....25°C
TIEMPO:	P1 y P2.....5, 15 y 30 min
	P3 y P4.....5, 15 y 30 min
	P5 y P6.....5, 3 x 5 y 6 x 5 min

De cada producción se conservaron 12 quesos sin presurizar, que se analizaron como *quesos control* (QC). Se presurizaron 6 quesos para cada uno de los tratamientos mencionados. Se destinaron a los análisis de la manera siguiente:

1 queso de cada tratamiento para el análisis de textura.
2.....desuerado por centrifugación.

Objetivos y plan de trabajo

2.....de composición y test triangulares.

1.....desuerado por gravedad, medida instrumental del color y microestructura analizada por microscopía laser confocal.

Para el resto de los análisis sensoriales y de microestructura por microscopía electrónica de barrido se elaboraron 3 producciones independientes.

Cada vez que se abría un envase se trasvasaba a una bolsa el suero liberado, a la que se iba incorporando todo el suero recuperado de los quesos sometidos a un mismo tratamiento. Las muestras de suero y de queso para los análisis de composición se conservaron a -30°C durante tres meses hasta que se procedió a su análisis.

Tabla II.1 Experiencias realizadas con microorganismos

Inóculo	<i>S. carnosus</i>			Sin inóculo	<i>Bacillus</i>
	<i>E. coli</i>	Cíclico	Con nisina		
Tratamiento	Continuo	Continuo	Con nisina	Con nisina	Germinación + inactivación
2°C	400 MPa/5,10 y 15m 450 MPa/5,10 y 15m 500 MPa/5,10 y 15m				
10°C	400 MPa/5,10 y 15m 450 MPa/5,10 y 15m 500 MPa/5,10 y 15m	500 MPa/1,2,3,4 y 5 ciclos de 5m 500 MPa/1,2,3,4, 5 y 6 ciclos de 5m	13,4 ppm: 500 MPa/5, 15 y 30m		
25°C	400 MPa/5,10 y 15m 450 MPa/5,10 y 15m 500 MPa/5,10 y 15m	500 MPa/5,10,15 y 30m	13,4 ppm: 500 MPa/5, 15 y 30m 3,68 ppm: 500 MPa/5m	8-10 ppm: 400 MPa/5m 500 MPa/2 y 3 ciclos de 5m 7,1 ppm: 500 MPa/5 y 30m	
50°C		500 MPa/15, 30, 45, 60 y 75m 500 MPa/5,10,15,30,45, 60 y 75m			
25°C - 25°C					60 MPa/210m-500 MPa/15m
30°C - 25°C					60 MPa/210m-500 MPa/15m
40°C - 25°C					60 MPa/210m-500 MPa/15m
40°C - 40°C					60 MPa/210m-500 MPa/15m

m=min

III. MATERIALES Y METODOS.

1. ELABORACION DEL *MATÓ*.

1.1 Quesos utilizados en las experiencias con microorganismos.

La leche utilizada en la elaboración del *Mató* procedía de un rebaño de 15 cabras de la raza Murciano-Granadina de la granja de la *Universitat Autònoma de Barcelona*. Se estandarizó al 4% de materia grasa. Se pasterizó a $90 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 min en un intercambiador tubular continuo de la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos de la misma universidad. Las producciones se realizaron con 40 l de leche pasterizada.

Parte de la leche pasterizada se inoculó con una suspensión de *Escherichia coli* 405 CECT o *Staphylococcus carnosus* 4491 CECT para obtener una carga aproximada de 10^6 UFC/ml. En las experiencias con *Bacillus subtilis* la carga de esporas obtenida en la leche fue aproximadamente de 10^4 UFC/ml. En las experiencias con nisina se dosificó Nisaplin[®] en la leche después de la inoculación de los microorganismos.

La leche se llevó a la temperatura de coagulación (32°C) en una cuba de doble camisa. Se añadieron 1ml de solución de CaCl_2 al 35% y 1 ml de renina (520 mg quimosina/l) por cada 5 l de leche. Pasados 45 min la cuajada se cortó en cubos de 2 cm^3 . Se dejó reposar durante 10 min y después se trasvasó con la ayuda de un colador a cestas metálicas (14 cm altura, 16 cm diámetro superior, 11 cm diámetro inferior) cubiertas con gasas de algodón. Los quesos se dejaron escurrir durante 1 h. El prensado se efectuó colocando un queso encima de otro durante una hora y pasado este tiempo se invirtió la posición, momento que se aprovechó para voltearlos. Así, la presión fue de $0,02\text{ kg/cm}^2$. El escurrido y el prensado se efectuaron en la sala de quesería a temperatura ambiente durante un tiempo total de 3 h. Los quesos se dividieron en cuatro porciones de $250 \pm 25\text{ g}$ que se envasaron al vacío y se mantuvieron en refrigeración o en baño de agua hasta que alcanzaron la temperatura de tratamiento.

Paralelamente se elaboraron quesos sin inocular siguiendo el mismo proceso de elaboración. Durante todo el proceso se observaron las medidas higiénicas necesarias para asegurar que no se incorporaban microorganismos contaminantes que pudieran interferir en los recuentos de los microorganismos inoculados.

1.2 Preparación de los inóculos.

Las cepas de *E. coli* y *S. carnosus* se obtuvieron liofilizadas de la CECT. Se reconstituyeron en 2-3 ml de caldo nutritivo (Oxoid, CM1) y se incubaron a 37°C/24 h. El cultivo se sembró en tubos con 9 ml de Caldo Nutritivo, que se incubaron de nuevo a 37°C/24 h. Una gota del cultivo se sembró en estría en tubos con Agar Nutritivo (Oxoid, CM3) inclinado, que se incubaron a 37°C/24 h y después se mantuvieron en refrigeración hasta la utilización de la cepa tras comprobar que el cultivo no se había contaminado. El día anterior a la producción se inoculó Caldo Nutritivo con la cepa escogida para la experiencia y se incubó a 37°C/18 h. Este cultivo se utilizó para inocular la leche pasteurizada a un nivel de 10⁶ UFC/ml.

1.3 Quesos utilizados en el análisis de las características físico-químicas.

El proceso de elaboración de estos quesos fue el mismo que el descrito para los quesos de las experiencias microbiológicas con algunas variaciones:

- la cuajada se colocó en moldes de plástico de 90 mm de diámetro cubiertos con gasas de algodón.
- los quesos se dejaron escurrir durante dos horas.
- se les aplicó una presión de 0,4 kg/cm² mediante prensa neumática durante 1 h a 14°C. A los 30 min de prensado se voltearon y se volvieron a colocar en la prensa.
- se obtuvieron 30 quesos de 275 ± 25 g.

2. TRATAMIENTOS DE ALTA PRESION.

Se utilizó un equipo isostático discontinuo fabricado por ACB (Nantes). El tiempo necesario para conseguir la presión de tratamiento estuvo entre 3 y 4 min dependiendo de la presión deseada, en las experiencias con *E. coli*. En el resto de experiencias realizadas, debido a la mejora del sistema de generación de presión del equipo, el tiempo de subida de presión se situó entre 80 y 110 s. El tiempo invertido en la descompresión estuvo entre 60 y 90 s. El recinto de presurización y el agua que contenía fueron enfriados o calentados hasta la temperatura de tratamiento con un flujo continuo de agua-etanol o agua respectivamente.

3. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS.

3.1 Preparación de la muestra.

En las muestras de leche se sembró 1 ml directamente en placa y se prepararon las diluciones decimales en solución de Ringer diluida 1/4. En el queso, se tomaron en condiciones estériles 10 g de muestra que se homogeneizaron en 90 ml de solución de citrato sódico al 2% (Peterkin y col., 1985) a 45°C durante 2 min con un homogeneizador electro-mecánico. El resto de diluciones decimales se preparó en solución Ringer 1/4.

3.2 Recuento de bacterias aerobias mesófilas (BAM).

Se realizó por inclusión, en agar de recuento en placa (PCA, Oxoid CM325). Las placas se incubaron a 30° C durante 48 h (ICMSF, 1983).

En las experiencias en las que se utilizó nisina combinada con alta presión en quesos elaborados a partir de leche sin inocular fue necesario disminuir el nivel de detección del método de recuento en placa. Se utilizó la técnica del número más probable (NMP) con caldo de triptona y soja (TSB, Oxoid, CM129). Se inocularon tres series de tres tubos con las diluciones -1, -2 y -3, que se incubaron a 30°C durante 48 h y se comprobó la presencia o ausencia de colonias por siembra en estría en placas con agar de triptona y soja (TSA, Oxoid, CM131) que se incubaron a 30°C durante 24 h.

3.3 Recuento de *Escherichia coli*.

Se sembraron en superficie placas con agar bilis rojo violeta (VRBA, Oxoid CM107) para determinar los recuentos de *E. coli* en leche y quesos. Después de la incubación a 37°C durante 24 h se contaron las colonias púrpura con halo del mismo color .

Para verificar la inactivación total de las células de *E. coli* se tomaron al azar muestras de quesos tratados y se incubaron a 37°C/18 h para permitir la recuperación de las células afectadas subletalmente. Se sembraron diluciones decimales en VRBA de las muestras incubadas para determinar la presencia de *E. coli*.

3.4 Recuento de *Staphylococcus carnosus*.

Se realizó por siembra en superficie de placas con el medio Baird-Parker (BP, Oxoid, CM275), enriquecido con emulsión de yema de huevo con telurito (Oxoid, SR54). Se incubaron a 37°C durante 48 h. Cuando fue necesario reducir el nivel de detección del método de recuento en placa se utilizó la técnica del NMP con caldo Giolitti-Cantoni (Oxoid, CM523) sin adición de telurito, para evitar que este componente pudiera afectar a la recuperación de células dañadas subletalmente. Los tubos con las series de diluciones decimales se incubaron a 37°C durante 48 h. Una gota del contenido de los tubos incubados se sembró en estría en placas con BP, que se incubaron a 37°C durante 48 h. Se confirmó, mediante tinción de gram, que las colonias contadas como típicas (negras, redondas y sin halo) fueran cocos gram positivos.

3.5 Esporas.

Se analizaron tres muestras de cada tratamiento. Para determinar los recuentos de esporas supervivientes a la alta presión las diluciones decimales en solución de Ringer 1/4 se sometieron a un tratamiento térmico de 80°C durante 10 min para inactivar las células vegetativas presentes en la muestra y estimular la germinación de las esporas (Westhoff, 1981; Moran y col., 1990; Marino y col., 1995). Los tubos se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y se sembró 1 ml de cada dilución en placas de PCA o en tubos de TSB para la técnica del NMP.

3.6 Expresión de los resultados.

En todos los casos, los resultados de los recuentos microbiológicos se expresan en unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo o mililitro, o bien en logaritmo de UFC (Log UFC/g o ml). La letalidad (L) se ha calculado como el logaritmo de UFC/g o ml antes del tratamiento menos el logaritmo de UFC/g o ml después del tratamiento.

4. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN NISINA.

Se realizó siguiendo el método de difusión publicado por Tramer y Fowler (1964). El medio de ensayo de nisina se preparó mezclando 10 g de peptona bacteriológica (Oxoid L37), 3 g de extracto de carne (Oxoid Lab-Lemco L29), 1,5 g de

extracto de levadura (Oxoid L21), 3 g de NaCl, 1 g de azúcar no refinado, 8 g de agar y un 2% de solución 1:1 de Tween 20 y Ringer 1/4 por cada litro de medio.

Se utilizó la cepa de *Micrococcus luteus* CECT 245. Se mezcló una suspensión de este microorganismo con el medio de ensayo. Seguidamente se prepararon extractos de la muestra cuyo contenido en nisina se quería determinar con HCl 0,02 N. Los extractos se colocaron, junto con las diluciones de la curva patrón en pocillos practicados en el medio que contenía *M. luteus*. Las placas se incubaron a 30°C/18 h para propagar el microorganismo. A continuación se midieron los halos de inhibición producidos en el medio por los extractos de muestra con nisina y las soluciones patrón.

5. ANALISIS DE COMPOSICION DE LECHE, QUESO Y SUERO.

Los análisis de composición se realizaron por duplicado en la leche de las producciones P1 a P6 y por triplicado en las muestras de queso y de suero.

Extracto seco total (EST). Se determinó por desecación en estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta alcanzar peso constante en la muestra. Se utilizaron 3 ml de leche o suero (FIL, 1987) ó 3 g de queso (FIL, 1982).

Contenido en cenizas (CEN). Se analizó en queso y suero por calcinación de la muestra en horno a 550°C (FIL, 1964)

Contenido en materia grasa (MG). Se utilizó el método de Gerber para la leche (FIL 1981), con la modificación de Van Gulik para quesos (FIL, 1991).

Contenido en nitrógeno total (NT). Se utilizó el método de digestión en bloque con modificación del método de Kjeldahl (FIL, 1993). Se analizó en leche, queso y suero.

Nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS). La extracción se realizó según el método de Kuchroo y Fox (1982). Esta fracción contiene proteínas séricas, la fracción proteosa-peptona, peptidos de bajo peso molecular y aminoácidos. Se utilizó para analizar leche, queso y suero.

Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (NNP). Según Kuchroo y Fox esta fracción se utiliza para estimar el contenido en nitrógeno no proteico. Se analizó en queso y suero según FIL (1993).

6. DETERMINACION DEL pH.

Se realizaron dos medidas potenciométricas por muestra de queso con un pH-metro de penetración CRISON micro-pH 2001 con electrodo combinado (Marth, 1978).

7. ANALISIS DE LAS VARIACIONES EN EL DESUERADO.

7.1 Estudios preliminares.

Análisis en porciones envasadas. Estos se realizaron con las muestras de queso elaborado a partir de leche inoculada con *Escherichia coli* tratadas a 2 y 10°C y los quesos no presurizados correspondientes. El análisis se efectuó por triplicado los días 1, 15, 30 y 60 después del tratamiento. En cada caso, se pesó la muestra de queso en su envase, lo que incluía: el peso del queso (Q), el peso del suero liberado (S) y el peso del envase (E). Después de retirar la muestra para el análisis microbiológico, se sacó el queso del envase y se pesó éste con su contenido, que incluía: el peso del suero liberado (S) y el peso del envase (E). La relación $\frac{S + E}{Q + S + E} \times 100$ indica el porcentaje de desuerado de cada muestra de queso, expresado como $\%DES_E$.

Análisis en muestras de geometría controlada. Estos se realizaron en cubos (1 cm^3) del interior del queso. Los cubos se colocaron en recipientes con el fondo cubierto por un papel de filtro que absorbió el suero liberado. El % de desuerado se calculó como:

$$\%DES = \frac{Q_i - Q_f}{Q_i} \times 100$$

siendo Q_i el peso inicial del cubo y Q_f el peso después del desuerado. La lectura del peso final se tomó al cabo de media hora, 1, 2 y 6 h.

7.2 Análisis del desuerado por gravedad.

Este método es una adaptación del descrito por Rosenberg y col. (1995). El análisis se realizó por cuadruplicado en cada muestra, cuatro días después del tratamiento por alta presión. Se tomaron dos porciones triangulares del interior del queso de $20 \pm 4 \text{ g}$ que se situaron encima de una reja metálica que presentaba una apertura de $2,7 \text{ mm}^2$. La reja se situó encima de un embudo que recogía en un vaso el

suero liberado. El sistema se dejó en reposo durante 6 h a 25°C. La parte superior del embudo se cubrió con papel de aluminio para prevenir el secado de la muestra. Se tomaron los valores del peso inicial de la muestra (Q) y del peso del suero liberado recogido en el vaso (S). Se calculó la pérdida de peso que suponía el suero liberado como porcentaje del peso original de la muestra:

$$\%DES_G = \frac{S}{Q} \times 100$$

7.3 Análisis del desuerado por centrifugación.

Para este análisis se tomaron seis réplicas de cada muestra dos días después del tratamiento, siguiendo el método utilizado por Guo y Kindstedt (1995) y Ramkumar y col. (1997) para evaluar la capacidad de retención de agua en *Mozzarella* y cuajadas frescas de *Cheddar*, respectivamente. Se tomó una muestra de queso de 80 g previamente homogeneizada manualmente durante 2 min. La muestra se centrifugó a 12500g durante 75 min a 25°C. El líquido liberado en la centrifugación contenía una fase acuosa y una fase grasa. Este líquido se trasvasó a una probeta graduada y se mantuvo en refrigeración durante 20 min para solidificar la fase grasa que se separó con la ayuda de una espátula. Seguidamente se tomó el peso de la fase acuosa como peso de suero liberado (S) y se calculó la pérdida de peso que suponía el suero liberado como porcentaje del peso original de la muestra al igual que en el análisis por gravedad ($\%DES_C$).

8. ANALISIS INSTRUMENTAL DE LA TEXTURA.

Se aplicó una compresión uniaxial del 80% a cubos de queso de 2 cm³ tomados del interior de los quesos. La compresión se realizó entre placas paralelas lubricadas con aceite de vaselina (Panreac) con un analizador de textura TA.XT2 (Stable Micro Systems). Las muestras se comprimieron a una velocidad de 1 mm/s. El análisis se realizó en ocho réplicas de cada muestra, previamente atemperadas a 7°C. Se transformaron los datos de las curvas fuerza/distancia proporcionadas por el texturómetro en los siguientes parámetros de textura (Kfoury y col., 1989; Delacroix-Buchet y Trossat, 1991; Rohm y Lederer, 1992 y Hsieh y col., 1993):

Esfuerzo (Stress) (N m⁻²), $\sigma = (F_t A^{-1})(h_t h_o^{-1})$. Relación entre la fuerza que actúa

sobre una superficie y el área de ésta.

Deformación relativa (Strain) (-), $\varepsilon = -\ln(h_t h_0^{-1})$. Deformación según *Hencky*.

Relaciona cualquier aumento en la deformación de una muestra ya deformada con la nueva dimensión de la muestra.

F_t : fuerza al tiempo t .

A : área de la muestra.

h_t : altura de la muestra al tiempo t .

h_0 : altura inicial de la muestra.

Esfuerzo en el momento de la fractura (esfuerzo) ($N m^{-2}$): es el esfuerzo máximo de la curva esfuerzo /deformación.

Deformación en el momento de la fractura (deformación): (-): es la deformación que se alcanza en el punto de la curva de máximo esfuerzo.

Módulo de Young o módulo de elasticidad ($N m^{-2}$): pendiente de la curva cuando la deformación es inferior a 0,04.

Trabajo (J): área bajo la curva hasta el punto de máximo esfuerzo.

9. ANALISIS INSTRUMENTAL DEL COLOR.

Los cambios en el color se evaluaron utilizando un colorímetro de superficie de esfera integradora Miniscan XE (Hunterlab). El iluminante utilizado fue Fcw y el observador 10°. Se utilizó la escala Hunterlab: L = luminosidad de negro (0) a blanco (100), a =color desde rojo (+) a verde (-) y b =color desde amarillo (+) a azul (-). El software del equipo calculó los siguientes índices:

Whiteness (Wi), grado en que la muestra se aleja del blanco perfecto.

$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$, medida de la diferencia del color de una muestra respecto a un patrón, que en nuestro caso es el queso no presurizado.

Se calcularon los valores de *chroma* (saturación) y *hue angle* (tono). Junto con la luminosidad (L) estos son los atributos de color de los que el ojo humano tiene percepción visual (Clydesdale, 1984).

Chroma (saturación del color o pureza del color por su grado de dilución con la luz blanca) = $(a^2 + b^2)^{1/2}$

Hue angle (tono) = $\tan^{-1}(b/a)$

Cada medida se repitió seis veces en distintas superficies del interior de los quesos y cuatro veces en superficies del exterior.

10. ANALISIS SENSORIAL.

Se realizaron tests triangulares en muestras del interior de los quesos, idénticas a las utilizadas para el análisis instrumental de la textura, con el fin de detectar la percepción de diferencias entre quesos presurizados y no presurizados. La superficie de los quesos se evaluó en escalas graduadas para el brillo (mate-brillante) y para la resistencia al morder. Asimismo, con las muestras que incluían la superficie del queso se realizaron tests de ordenación según preferencia. Los catadores fueron miembros no entrenados del personal de la facultad, familiarizados con estos tipos de análisis y con experiencia en la evaluación de quesos. Los formularios utilizados se muestran en las Figuras III.1 a III.3.

Figura III.1 Formulario utilizado en las pruebas triangulares.

Nombre:	
Fecha:	
Después de examinar detenidamente estas muestras, indica cuál es la diferente en cada triada:	
<u>Código muestras:</u>	<u>Código de la muestra diferente:</u>
-----	-----
-----	-----
-----	-----

Figura III.2 Formulario para las pruebas de ordenación según preferencia, realizadas en muestras que incluyen la superficie del queso.

Nombre:	
Fecha:	
Ordena estas dos muestras según tu grado de preferencia. Escribe en la izquierda del formulario (primera posición) el código de la muestra que te gusta más, y a la derecha el de la que te gusta menos.	
-----	-----

Figura III.3 Formulario para la evaluación sensorial de las muestras de queso que incluyen la superficie.

Nombre:	
Fecha:	
Evalúa el color y la textura de estas dos muestras colocando una cruz en la graduación de la escala situada al lado de cada atributo:	
<u>Código muestra:</u>	
Color de la superficie:	mate _____ brillante 1 2 3 4 5
Resistencia de la superficie al morder:	- _____ + 1 2 3 4 5
<u>Código muestra:</u>	
Color de la superficie:	mate _____ brillante 1 2 3 4 5
Resistencia de la superficie al morder:	- _____ + 1 2 3 4 5

11. MICROESTRUCTURA.

11.1 Microscopía laser confocal (MLC).

Tinción de la muestra. Las muestras de queso se cortaron con la ayuda de un bisturí inmediatamente después de sacarlas de la cámara de refrigeración para prevenir el desuerado. Para teñir la proteína, se introdujo una porción de queso de aproximadamente 1 mm de grosor en una solución acuosa de naranja de acridina al 0,1% mezclada con ácido acético al 1% en proporción 1:1 durante 5 min (Yiu, 1985). Para teñir la fase grasa, las muestras de queso se introdujeron en una solución acuosa de azul del nilo al 0,02% durante 5 min. Después de dos lavados con agua destilada, las secciones de queso se colocaron en un portaobjetos excavado y se cubrieron con medio de observación no fluorescente y con el cubreobjetos.

Observación al microscopio. Las imágenes se tomaron con un microscopio láser confocal Leica TCS4D (Heidelberg). Las muestras teñidas con naranja de acridina se excitaron con láser Kr/Ar a 568 nm. En las muestras teñidas con azul del nilo, cuando

se utilizó una longitud de onda de 568 nm se pudieron observar simultáneamente la fase proteica y la fase grasa. Cuando la misma muestra se excitó con una longitud de onda de 488 nm sólo pudo apreciarse la fase grasa. El *software* del equipo permitió realizar una composición con las dos imágenes de una misma muestra obtenidas a las distintas longitudes de onda. Para obtener información de la microestructura a nivel tridimensional, se construyeron imágenes estereoscópicas a partir de varias secciones adyacentes de una misma muestra (Heertje y col., 1987). La distancia de separación entre cada capa de muestra en las imágenes tridimensionales se fijó en 0,5 μ .

11.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Preparación de la muestra. Se cortaron muestras de queso de aproximadamente 1 mm de grosor. Se fijaron con glutaraldehído 2,5% en solución tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado con tampón cacodilato sódico se sumergieron en tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato durante 2 h, con el fin de fijar la grasa. Pasado este tiempo, se sometieron a un nuevo lavado con tampón cacodilato y se procedió a la deshidratación de la muestra, que consistió en inmersiones de la muestra en soluciones de concentración creciente de etanol (30, 50, 70, 90 y 100% v/v). Las muestras estuvieron sumergidas en cada una de estas soluciones durante 30 min.

Se realizó la desecación por punto crítico con CO₂ líquido en un equipo Polaron. Las muestras se montaron en soportes de aluminio y se metalizaron con oro-paladio en un equipo SEM Coating Unit E-5000 (Polaron Equipment Ltd.). El examen de las muestras se realizó con un microscopio Hitachi S-570 SEM, operando a 8 kV.

12. ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizó con el programa SPSS versión 6.1.2 (SPSS Inc., *Centre de Càlcul*, UAB). Las comparaciones entre quesos control y quesos presurizados se efectuaron mediante Anova de un factor y se realizaron comparaciones pareadas de las medias con el test de Tukey. Para comparar dos medias se realizaron T-tests en grupos

independientes. Cuando no se indica otro valor, $p < 0,05$.