



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Métodos empleados en la industria alimenticia para la conservación de la leche. Revisión bibliográfica.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

CRUZ RANGEL HUGO AGUSTÍN

ASESORA

Dra. ESPERANZA GARCÍA LÓPEZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen.....	1
Introducción	2
Objetivos	3
Marco teórico	4
Capítulo 1	4
1.0 La leche y su importancia en el mundo.....	4
1.1 Importancia económica de la leche en México	4
1.3 Composición general de la leche, características fisicoquímicas y factores que los alteran.....	5
1.4 Microbiota de la leche y su importancia en la calidad.....	13
Capítulo 2.....	18
2.0 Métodos para la conservación de la leche.....	18
2.1 Tratamientos térmicos.....	18
2.1.1 Refrigeración.....	19
2.1.2 Congelación	22
2.1.3 Termización.....	28
2.1.4 Pasteurización.....	29
2.1.5 Esterilización (UHT).	31
2.1.6 Deshidratación.	33
2.1.7 Inducción electromagnética - microondas.....	35
2.1.8 Calentamiento óhmico.....	37
2.1.9 Radiofrecuencia.	39
2.2 Tratamientos no térmicos	41
2.2.1 Ultrasonido (Sonicación).....	41
2.2.2 Aditivos.....	44
2.2.3 Conservación con CO2.....	48
2.2.4 Irradiación (Ionización).	50
2.2.5 Altas presiones hidrostáticas.	53
2.2.6 Ultra altas presiones por homogeneización.	58
2.2.7 Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF).....	62
2.2.8 Campos magnéticos oscilantes	70
2.2.9 Plasma no térmico.	73
2.2.10 Centrifugación (Bactofugación).....	75
2.2.11 Microfiltración.	78
2.2.12 Luz de alta intensidad.....	84

2.3 Combinación de procesos de conservación.....	89
2.3.1 Termosonicación.	90
2.3.2 Manotermosonicación	92
2.3.3 HHP y Temperatura.....	92
2.3.4 PEF y temperatura	93
2.3.5 UV-C, vacío y pasteurización.	94
2.3.6 Termorradiación.....	94
2.3.7 Bacteriocinas, HHP, PEF y pasteurización.....	95
2.4 Inactivación de enzimas relacionadas con la calidad alimentaria por combinación de tecnologías no térmicas con otros factores de conservación....	98
Discusión.....	99
Conclusión	105
Bibliografía	106

Resumen

El sector lechero es históricamente uno de los primeros sectores del área alimentaria donde se introdujeron criterios microbiológicos a lo largo de la cadena de producción para salvaguardar y monitorear la calidad del procesamiento del producto lechero. Es por ello que la investigación de nuevos tratamientos ha ido creciendo en los últimos años, satisfaciendo las demandas de productos de mejor calidad y asegurando la inocuidad a menores costos, tales como el uso de ultrasonido, luz ultravioleta o irradiación, permitiendo el almacenamiento por largos periodos.

En materia de calidad, la calidad sanitaria se puede concebir en parámetros de carga mesofílica total, cuenta de coliformes y carga de células somáticas entre otros. Uno de los objetivos principales de los tratamientos térmicos convencionales es inactivar cualquier microorganismo patógeno en la leche, al mismo tiempo que prolonga su vida útil reduciendo las cargas microbianas de bacterias de deterioro y la actividad enzimática. Sin embargo, la principal desventaja de la pasteurización comercial es la degradación de los componentes de calidad y propiedades nutricionales del producto, debido al intenso tratamiento térmico y la posterior destrucción de proteínas y vitaminas, incluidos cambios indeseables en otras características como el sabor y el color. Para minimizar tales desventajas de los tratamientos térmicos a base de calor, al mismo tiempo que se garantiza la calidad microbiológica del producto, se han probado algunas nuevas tecnologías basadas en diferentes factores de conservación como alternativas a los tratamientos tradicionales. Dentro los tratamientos alternativos a los térmicos se encuentran los campos de pulsos eléctricos, campos magnéticos oscilantes, irradiación, ultrasonidos, microfiltración, centrifugación, las altas presiones hidrostáticas, los pulsos de luz de alta intensidad, luz ultra violeta y más recientemente la ultra alta presión homogenización.

Introducción

La NOM-243-SSA1-2010 define la Leche, como la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro. Otra definición es que se considera como cruda a cualquier leche que no haya sido sometida al menos a tratamientos térmicos de pasteurización (Flores, 2015). La leche constituye uno de los principales alimentos para los mamíferos y específicamente, para el ser humano; por ello su calidad debe ser óptima y debe cumplir con todos los aspectos nutricionales y de inocuidad (Carrillo *et al.*, 2016). Para ello, los departamentos de salubridad en diferentes países han establecido reglamentos para asegurarse de que la leche que entra al mercado esté tenga buen sabor y principalmente esté libre microorganismos causantes de enfermedades. Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas de leche en diversas presentaciones. México es responsable del 1.8% de la producción total a nivel mundial y es el 9° país en el consumo de éste producto.

Es debido al alto consumo de leche y a su naturaleza perecedera, que la constante demanda en la calidad de los productos lácteos, ha impulsado la investigación continua para el desarrollo de nuevas tecnologías en materia de conservación; innovando nuevas formas de mantener viable la leche desde algunas semanas hasta años, algo que en la antigüedad era inconcebible. La principal finalidad de las tecnologías desarrolladas para la conservación y/o transformación de alimentos, es obtener productos seguros con calidad organoléptica, nutricional y microbiana aceptables. Estos métodos pretenden ser equivalentes y desplazar en un futuro a los tratamientos térmicos.

El siguiente trabajo tiene la finalidad de dar a conocer las técnicas que actualmente se usan para la conservación de la leche, sus características, sus mecanismos de acción, sus ventajas y desventajas; así como algunas de las combinaciones que hay entre las mismas tecnologías con el fin de mantener y/o mejorar la calidad del producto, manteniendo sus características de origen como el color, sabor, olor y apariencia, desde los métodos tradicionales con base en las altas temperaturas hasta el uso de tecnologías “frías” como el ultrasonido o la irradiación.

Objetivos

Objetivo general: Recopilar y comparar en un documento escrito los diferentes métodos que se emplean en la industria alimentaria utilizadas en materia de conservación de la leche, presentando las características más importantes de cada una de ellas y el principio por el cual funciona.

Objetivo particular: Dar a conocer cuáles son las ventajas, desventajas de los diferentes métodos de conservación de la leche y cuál es su eficacia contra algunos microorganismos

Marco teórico

Capítulo 1

1.0 La leche y su importancia en el mundo.

El sector lechero es históricamente uno de los primeros sectores del área alimentaria donde se introdujeron criterios microbiológicos a lo largo de la cadena de producción para salvaguardar y monitorear la calidad del procesamiento del producto lechero (Mansel, 2010). Para ello, los departamentos estatales de salubridad de las ciudades han establecido reglamentos para asegurarse de que la leche que entra al mercado esté limpia, que tenga buen sabor y esté libre de microorganismos causantes de enfermedades, asegurando un producto inocuo (que no hace o causa daño a la salud) (Elwood, 1972; NOM-251-SSA1-2009). Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas de leche en diversas presentaciones. Para 2021, México consumió 16 mil millones de litros. El 85% de esta producción corresponde a leche de vaca y el resto a otras especies (Secretaría de Economía, 2012).

1.1 Importancia económica de la leche en México

México se establece como el 13° productor de leche en el mundo, aportando con un 1.8% de la producción total a nivel mundial y es el 9° país en el consumo de este producto con un consumo *per-cápita* de 103.3 L por año en 2019 (Secretaría de economía, 2012; SIAP, 2019). Según datos de la FAO, la producción nacional total promedio entre los años 2014 a 2017, fue de 11,475,060 toneladas de leche. A nivel nacional, la producción de leche de bovino ocupa el 3° lugar en el valor de la producción pecuaria nacional con el 17%, quedando debajo de la carne de bovino y la carne de ave. Así mismo, la elaboración de productos lácteos representa el 3° lugar del Producto Interno Bruto (PIB) de la industria alimentaria, ocupando el 10% de ésta (CANILEC, 2018). En la Tabla 1, se puede observar el consumo *per cápita* en los últimos 4 años, así como su valor monetario y cuánto se ha tenido que importar anualmente para cubrir la demanda nacional.

Tabla 1. Consumo, demanda y valor de leche en México 2015-2019. (Tomado y adaptado de Atlas agroalimentario SIAP, 2016,2017,2018, 2019 y 2020).

Año	Consumo per cápita (Litros)	Producción nacional (millones de litros)	Valor (millones de pesos)	Importaciones (miles de litros)	Valor (millones de dólares)
2015	93.8	11.395	66.970	140,758	725
2016	95.1	11.608	67.751	402,555	691.7
2017	97.9	11.768	70.660	447,250	824
2018	99.0	12.006	73.688	502,389	845
2019	103.3	12.276	79.597	479,707	1028

1.3 Composición general de la leche, características fisicoquímicas y factores que los alteran.

COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Sólidos totales

Los sólidos totales son la sumatoria de los porcentajes de las proteínas, de la grasa en emulsión, lactosa, vitaminas y sales. Por lo tanto, una disminución o aumento en alguno de estos constituyentes puede influenciar el contenido total de los sólidos; siendo el porcentaje de grasa, el factor que más influye en la sumatoria. La determinación del porcentaje de sólidos totales, reviste importancia en cuanto a la manera de detectar adulteraciones por agua en la leche. (Calderon *et al.*, 2007)

Proteína

La proteína constituye entre el 3.1 y 3.9% de los sólidos totales de la leche de vaca. Ésta debe de estar en un mínimo de 30 g/L. Puede dividirse en dos grupos la caseína y proteínas del suero. Las caseínas son por definición un conjunto de polipéptidos sintetizados en la glándula mamaria de la vaca, forman la fracción más importante de la leche, pertenecen al grupo de las gluco-fosfoproteínas y precipitan a pH de 4.6 a 20 °C y debe de contar con un

mínimo de 24g/L. (NOM-155-SCFI-2012, Calderon *et al.*, 2007) Dentro de la caseína, se encuentran la α S1, α S2, β y la κ . Dentro de las proteínas del suero se incluyen α lactoalbúmina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas y seroalbuminas. Actualmente, ha adquirido una mayor importancia la kappa-caseína; debido a que conforma y retiene una mayor cantidad de sólidos, formando una cuajada más firme y densa; lo que influye sobre el mayor rendimiento de la conversión de leche en cuajada. (Calderon *et al.*, 2007)

Azúcares

La lactosa es el principal azúcar de que hay en la leche y los productos lácteos. Se encuentra formada por una molécula de glucosa y una de galactosa, dos azúcares simples que el cuerpo utiliza directamente como fuente de energía. Aunque la glucosa se puede encontrar en varios tipos de alimentos, la lactosa es la única fuente de galactosa; ésta desempeña varias funciones biológicas y participa en los procesos inmunitarios y neuronales, formando parte de varias macromoléculas como cerebrósidos, gangliósidos y mucoproteínas, que son constituyentes importantes de la membrana de las células nerviosas. (Lukito *et al.*, 2015)

Junto con las cetonas, los alcoholes primarios y secundarios, los azúcares son considerados los compuestos más importantes en el aroma y sabor. La síntesis de alcoholes puede ser llevada a cabo por distintas vías: metabolismo de lactosa (formación de etanol por vía de la pentosa fosfato), degradación de metil cetona (por vía de la actividad de reductasa), metabolismo de aminoácidos, etc. Siendo la primera la más importante. (Del castillo 2010)

Grasas

La grasa es la responsable del aroma, sabor, cuerpo y textura. El porcentaje de grasa en leche de vaca ronda entre el 3.5 y 5.0%, siendo influenciado por factores como la raza, edad de la vaca, estado nutricional, estado de la curva de lactancia y tipo de alimentación. (Calderon *et al.*, 2007)

Los ácidos grasos liberados de la lipólisis pueden ser de cadena larga, media o corta. Los de cadena larga (mayores a 12 C) tienen un papel menor en el desarrollo del aroma, debido a que tienen un umbral de percepción muy alto, mientras que los ácidos de cadena corta o media tienen un umbral mucho menor y cada uno presenta una nota aromática característica. Para los ácidos grasos insaturados, el aroma puede variar según el isómero del que se trate. Para los etil ésteres de ácidos grasos de cadena larga, mayores de 12 carbonos, al encontrarse a niveles altos proporcionan un indeseable aroma jabonoso o ceboso. Comúnmente los ácidos grasos tienen un umbral de percepción de aroma más alto que el de

los ésteres que forman, y proporcionan notas de aroma rancio, acre, jabonoso o ceroso. (Del castillo, 2010).

Los ácidos grasos libres son importantes en el desarrollo de aromas y sabores en los productos lácteos, no sólo por el aroma que tienen por sí mismos, también son precursores de otros compuestos, como en el caso de cetonas, alcoholes, lactonas y ésteres. Las cetonas son formadas, a partir de ácidos grasos, a través de β oxidación, que consiste en la oxidación del ácido graso a β -cetoácidos y su descarboxilación para dar lugar a 2-alcanonas con un carbono menos en su estructura. Estas cetonas pueden ser reducidas después a su correspondiente alcohol secundario, y puede ser reversible en condiciones aeróbicas. (Del castillo 2010)

Las lactonas son compuestos cíclicos formados por la esterificación intramolecular de los hidróxiácidos grasos. La formación de estos hidróxiácidos grasos precursores de las lactonas puede llevarse a cabo en la glándula mamaria, a través de una β -oxidación, o como parte del catabolismo normal de los ácidos grasos, incluso por la acción de enzimas sobre ácidos grasos insaturados. La formación de las lactonas a partir de su correspondiente hidróxiácido es llevada a cabo espontáneamente una vez que el ácido graso ha sido liberado por lipólisis. Este ácido graso al encontrarse como parte de un triacilglicerido no produce aroma ni sabor, pero al ser liberado y formar una lactona, sus características sensoriales cambian. Este fenómeno puede ser observado tomando como ejemplo a la mantequilla cuyo olor característico se transforma al calentarla, liberando un aroma dulce o caramelizado por efecto de la lipólisis y posterior formación de lactonas. Las lactonas están generalmente caracterizadas por un muy pronunciado aroma con toque frutal, siendo las δ lactonas las que tienen un umbral de percepción mayor. (Del castillo 2010)

Los ácidos grasos libres son precursores de otros compuestos importantes para el aroma llamados ésteres. Los ésteres son probablemente los productos más importantes para el aroma de los productos lácteos y son constituyentes volátiles muy comunes cuya contribución depende de la concentración en la que se encuentran presentes, ya que a pesar de la presencia de ésteres con propiedades aromáticas frutales, esta característica no tiene porque ser necesariamente discernible ni provocar que el producto lácteo final tenga un aroma frutal indeseado, sino que, por reacciones de sinergismo, estos compuestos en conjunto contribuyen al aroma y sabor del lácteo. Un ejemplo de esto lo dan los etil esterres derivados de los ácidos grasos de cadena corta, regularmente etil butanoato y etil hexanoato, que al estar en niveles excesivamente altos en leche cruda o pasteurizada o incluso en el queso Cheddar le confieren un indeseable aroma frutal. (Del castillo, 2010).

Tabla 1.3-1. Principales componentes de leche en diferentes razas y especies (Tomado y adaptado Cervantes, 2005)

Especie	Composición en porcentaje				
	Grasa	Proteína	Lactosa	Cenizas	Sólidos totales
Vaca Suizo	4.0	3.6	5.0	0.7	13.3
Vaca Holstein	3.5	3.1	4.9	0.7	12.2
Vaca Cebú	4.9	3.9	5.1	0.8	14.7
Vaca Jersey	5.5	3.9	4.9	0.7	15
Cabra	3.5	4.9	4.6	0.79	13.79
Oveja	5.3	5.5	4.6	0.9	16.3
Búfala	10.4	5.9	4.3	0.8	21.4
Yegua	1.6	2.7	6.1	0.51	10.91
Mujer	4.5	1.1	6.8	0.2	12.6

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

Acidez

En lo que concierne a los aspectos físico-químicos de la leche, la acidez constituye el parámetro de mayor variabilidad entre los animales de una misma raza.

La NOM-155-SCFI-2012, menciona que la acidez para la leche entera, se establece entre los 1.3 a los 1.7 grs de ácido láctico/ L. La leche normal presenta una variación de pH de entre 6.6 a 6.8, lo que corresponde a 16-18° en la escala Dornic (°D) (De los Reyes *et al.*, 2010) La acidez, es producida por el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas; que transforman la lactosa en ácido láctico, acético y propiónico y ácidos grasos y acetona provenientes de la utilización de las grasas; mientras que, el metabolismo de las proteínas, produce indicadores de putrefacción como indol. El incremento de éstos metabolitos llega a desestabilizar la leche por aumento de la acidez. (Calderon *et al.*, 2007)

Índice crioscópico

El índice crioscópico (IC) corresponde a la temperatura de congelamiento de la leche, cuyo valor oscila entre -0.553 y -0.551°C, esto se debe a la presencia de componentes lácteos solubles en agua, principalmente los minerales y la lactosa. Así mismo, los componentes insolubles de la leche como la grasa no interfieren en el valor de IC. De este modo, las alteraciones encontradas en este índice revelan generalmente adición de agua en la leche. De entre las posibilidades de adición accidental, se destacan los residuos de agua en baldes y perolas o drenaje incompleto después de la limpieza de los sistemas de ordeño mecánico o tanques de enfriamiento. Una leche con punto de congelación diferente puede ser indicio de leche adulterada. (De los Reyes *et al.*, 2010)

Densidad

La densidad se puede definir como el peso de un litro de leche expresado en kilogramos. La densidad es una propiedad física utilizada para comparar las masas de diferentes sustancias o de una misma bajo diferentes condiciones. (De los Reyes *et al.*, 2010) En la densidad de la leche influyen todos los constituyentes normales, así como todas aquellas sustancias extrañas que se adicionan de forma fraudulenta, tanto sólidos como líquidos. (Periago, 2012) Generalmente, el tiempo que tarda en estabilizarse el valor de densidad de la leche depende de la temperatura anterior de almacenamiento. A 15°C tarda de 1 a 2 días, mientras que a 50°C lo suele hacer en seis horas. Este comportamiento recibe el nombre de Fenómeno de Recknagel, y depende de la lenta solidificación de la grasa y de la disminución de la cantidad de agua libre. (Periago, 2012) Se ha establecido que la densidad de la leche cruda a 15°C, se encuentra entre 1.027 a 1.033g/ml. Este valor ocurre por la presencia de los varios componentes de la leche diluidos o no, en el agua que constituye la leche, los cuales presentan densidades variables. De esto, la grasa es la única sustancia que presenta densidad casi igual al del agua. (De los Reyes *et al.*, 2010) (Calderon *et al.*, 2007). El valor debajo de este nivel puede significar adición de agua, o sea, dilución de la leche. Por otro lado, si se obtienen valores arriba del parámetro normal, indica probablemente leche con muy baja concentración de grasa o leche descremada lo que es un fraude (De los Reyes *et al.*, 2010)

Punto de ebullición

Es la temperatura a la cual se efectúa la ebullición de una sustancia líquida. Cuando dicha sustancia comienza a ebullición o hervir no es posible aumentar más la temperatura, la cual se mantendrá constante y será siempre la misma para el mismo líquido. La leche hierve de 100.17 a 100.5° C a la altura del nivel del mar, es decir a 760 mmHg debido a su contenido de sustancia Soluble (Feitosa et al., 2018)

Conductividad eléctrica

La conductividad se define como la capacidad de una sustancia de conducir la corriente eléctrica. La unidad de medición utilizada comúnmente es el Siemens/cm (S/cm). Esta variable depende de la cantidad de sales disueltas presentes en un líquido y es inversamente proporcional a la resistividad del mismo. La conductividad se obtiene aplicando un voltaje entre dos electrodos y midiendo la resistencia de la solución. Las soluciones con conductividad alta producen corrientes más altas.

En la leche, el valor de la conductividad eléctrica está dado principalmente por la presencia de iones de como cloruros, fosfatos, o calcio, y en menor cantidad por otros elementos como

el sodio teniendo una conductividad normalmente entre 40 y 50 mS/cm o 0.005 ohm a 25°C (Elizalde, et al, .2009).

Viscosidad

La viscosidad de la leche se define por su grado de resistencia al flujo, que aumenta con: disminución de temperatura, aumento de contenido graso, homogeneización, fermentación, envejecimiento y altas temperaturas seguidas de enfriamiento. La viscosidad media de la leche es 2,2 y el agua 1,0 (medida a 20 ° C). (Feitosa et al., 2018)

Tabla 1.3-2, valores de las diferentes características y especificaciones fisicoquímicas en leche de vaca y pruebas de la leche (Tomado y adaptado Periago, 2012, REGLAMENTO de Control Sanitario de Productos y Servicios, 1999, NOM-155-SCFI-2012)

Característica fisicoquímica	Valor Reglamento de control sanitario de productos y servicios
Densidad a 15.5°C	>1.031
Acidez	1.3 a 1.7g/L
Punto crioscópico	-0.53 a -0.55°C
Punto de ebullición	100.5°C
Conductividad eléctrica	40-50 mS/cm
Índice de refracción	37-39 a 20°C
Cloruros	0.8 a 1 g/L
Proteínas	>30g/L
Caseína	>24g/L
Lactosa	43 a 52 g/L
Grasa butírica	>30 g/L
Sólidos no grasos	83 a 89/g/L
Coagulación por ebullición	Negativa
Prueba alcohol al %68	Negativa
Prueba de inhibidores	Negativa
Prueba de Sacarocinta	Negativa

FACTORES QUE ALTERAN LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LA LECHE

Otros factores que alteran a la composición de la leche son la luz, la temperatura, el pH, el oxígeno, la concentración de sodio, principalmente por la fermentación láctica realizada por las bacterias presentes en ésta como ya se ha mencionado (Carrillo *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2009; Spreer, 1991; Barbosa *et al.*, 2010).

Tabla 1.3-3 Alteraciones de sabor observadas en leche. Causas y consecuencias (Feitosa *et al.*, 2018)

CAMBIOS DE SABOR	CAUSA Y CONSECUENCIA
Hervido, caramelizado o quemado	Relacionado con el proceso de tratamiento térmico (intensidad de temperatura / tiempo, superficie de calentamiento del pasteurizador, etc.). la leche de larga duración puede tener un sabor definido como 'sabor a leche esterilizada', que recuerda al de la leche hervida
Rancio, "de cabra" o butírico	Causado por la hidrólisis de triglicéridos por lipasa
Ácido, amargo, verdadero, maloliente, pútrido	Suele estar relacionado con la contaminación microbiana, especialmente con bacterias psicotróficas y coliformes.
Metálico, aceitoso, papel, pescado, cartón, sebo	Resulta de la oxidación de los ácidos grasos insaturados contenidos en la grasa de la leche por el oxígeno molecular. Este defecto a veces se confunde con enranciamiento. Los principales catalizadores de oxidación son: luz, cobre y en menor medida, el hierro. La vitamina A puede sufrir un deterioro oxidativo, lo que da como resultado sabores a heno, paja o fruta. Esta reacción es catalizada por la luz y ocurre en la leche desnatada y fortificada con vitamina A.
Sabores transmitidos por la comida, sabor "a vaca" o "de corral"	Se puede transferir a la leche (en la ubre) a través del sistema respiratorio o digestivo, a través del torrente sanguíneo. Prácticamente todo lo que come la vaca interfiere con el sabor de la leche.
Otros sabores: "Gis", "extraño", "salado", "pasado".	son sabores sin causa específica o que no están definidos en términos sensoriales pudiendo aparecer esporádicamente

Color

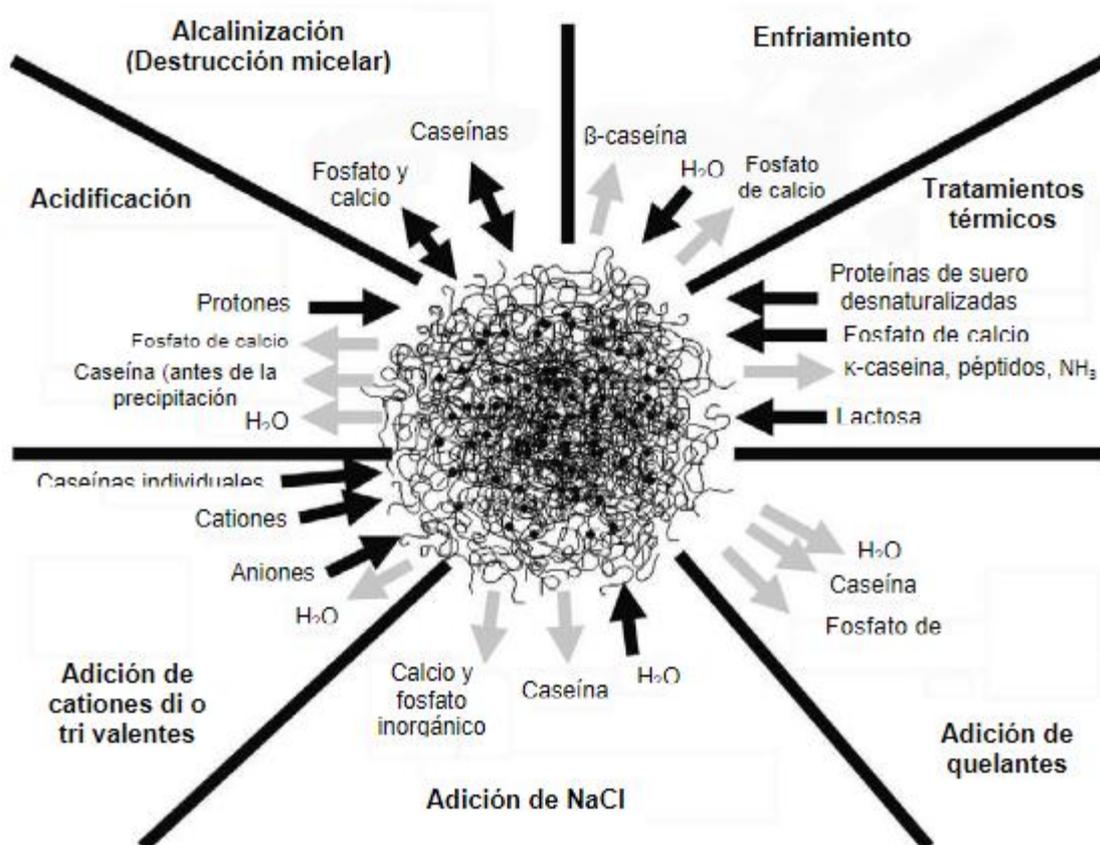
El color de la leche (definido como blanco amarillento y opaco) se debe principalmente a la dispersión de la luz por las micelas de fosfocaseinato de calcio. Los glóbulos de grasa también dispersan la luz, pero contribuyen muy poco al color blanco de la leche. Caroteno y riboflavina contribuyen al color amarillento. El uso, de temperatura más alto durante la pasteurización

realza el color blanco y la opacidad. La esterilización (tratamiento térmico por encima de 100 °C) lo oscurece. La leche desnatada, por otro lado, adquiere un color blanco azulado. (Feitosa *et al.*, 2018)

Sodio

En la composición salina de la leche, se producen variaciones importantes que contribuyen a explicar las diferencias estacionarias y regionales de la leche. Las leches de principio y final de la lactación contienen menor cantidad de ácido cítrico y de potasio, pero más cloro, sodio, calcio y magnesio que las leches en plena lactación. Además, la composición de la leche de vacas enfermas tiende a parecerse a la de la sangre, por lo que las leches mamáticas son más saladas (mayor contenido en cloro y sodio), debido a las alteraciones en la permeabilidad de los alveolos. El contenido normal de sales en la leche, expresado como porcentaje de cenizas debe ser mayor de 0.64% (con un valor alrededor de 7 g/litro). Del total de sales minerales el cloruro sódico es uno de los componentes mayoritarios con un valor que oscila entre 1.5 y 1.8 g/L (que se corresponde con 1 g de Cl/L y de 0.5 g de Na/L) (Periago, 2012)

Figura 1.3-1. Modificaciones en la composición de las micelas de caseína en función de diferentes condiciones fisicoquímica (Tomado Velasco, 2017)



1.4 Microbiota de la leche y su importancia en la calidad.

Las proteínas, grasas, carbohidratos, minerales, vitaminas y alto porcentaje de agua que se encuentran en este producto lo convierten en un excelente sustrato para el crecimiento principalmente bacterias, pero también puede haber crecimiento de hongos y levaduras. Cuando se hace referencia a la calidad de la leche, frecuentemente se abordan tres aspectos: la composición (calidad composicional), la presencia de microorganismos y el recuento de células somáticas (RCS) (calidad sanitaria). (Carrillo *et al.*, 2016). Villegas *et al.*, (2010), conciben la calidad sanitaria en parámetros como carga mesofílica total, cuenta de coliformes, carga de células somáticas, presencia de inhibidores y adulterantes. Dentro de las bacterias presentes en los alimentos, se pueden clasificar en tres categorías:

- Psicrófilos: Pueden crecer a temperaturas de 7°C o menos. El género más común perteneciente a este grupo es del de las *Pseudomonas*.
- Mesófilos: Crecen entre 10° a 40° C. Normalmente pertenecen a los grupos de las bacterias ácido lácticas, coliformes y bacterias esporuladas (*Bacillus spp.* y *Clostridium spp.*)
- Termófilos, usados en procesos tecnológicos. Se caracterizan por crecer entre los 35 y 60 °C (Spreer, 1991; Pereda, 2009).

Las principales fuentes de microorganismos más significativas son el instrumental, la microbiota endógena y las superficies que contactan con la leche como son los tubos y máquinas ordeñadoras, así como los coladores, recipientes, tuberías y circuitos de refrigeración. Si los utensilios o las superficies se limpian, desinfectan o secan inadecuadamente, las bacterias pueden multiplicarse en los residuos lácteos, contaminando a la leche que entre en contacto con estas superficies. Entre las bacterias más comunes procedentes de éstos orígenes se incluyen a los estreptococos lácticos, bacterias coliformes, bacilos Gram-negativos psicrófilos, así como termodúricos resistentes a la pasteurización, como lo pueden ser micrococcos, bacilos y brevibacterias. (Frazier *et al.*, 1993). En ranchos de México en la zona del altiplano, donde se practica la ordeña manual, los microorganismos con frecuencia aislados son *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus spp.*; en tanto que en donde se realiza ordeño mecánico, la prevalencia resulta ser de *Streptococcus spp* (Ávila *et al.*, 2009). A pesar de que el desarrollo de microorganismos es lento a temperatura de entre 0 y 5°C, se pueden producir cambios no deseables. Dichos cambios dependerán de los tipos de microorganismos que presentes y de los niveles que se alcancen. Aunque los tratamientos térmicos destruyen algunas de las bacterias, sus enzimas permanecen activas y pueden generar modificaciones no deseables en los productos (ICMSF, 1985). Se ha observado que,

en la leche ordeñada de manera aséptica, el conteo en placa de UFC oscila entre 500 y 1,000 UFC/ml; sin embargo, al estar en el tanque de leche, éste número puede elevarse hasta 5,000 - 20,000 UFC/ml (Frazier *et al.*, 1993).

Tabla 1.4-1. Clasificación de los principales microorganismos presentes en la leche (Fernandez, 2012)

Patógenas	Alterantes
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus cereus</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Yersinia enterocolitica</i> • <i>Salmonella spp</i> • <i>Escherichia coli O157:H7</i> • <i>Campylobacter jejuni</i> • <i>Brucella abortus</i> • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> • <i>Clostridium botulinum</i> • <i>Coxiella burnetii</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus lactis</i> • <i>Streptococcus cremoris</i> • <i>Lactobacillus casei</i> • <i>Lactobacillus delbrueckii</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Leuconostoc spp</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>Bacillus stercorarius</i> • <i>Bacillus sporothermodurans</i>

Tabla 1.4-2 Límites máximos de contenido microbiano para leche (Tomado u adaptado NOM-243-SSA1-2010)

Microorganismo	Límite máximo
Coliformes totales	≤20 UFC/g o ml en punto de venta ≤10 UFC/g o mL en planta
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤10 UFC/ mL por siembra directa
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o mL
<i>Escherichia coli</i>	≤ 3 NMP/g o mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g o mL
Enterotoxina estafilococcica	Negativa

Mastitis

La mastitis es definida como la inflamación de la glándula mamaria y se caracteriza por el aumento en la concentración de células somáticas en leche. Estas son en su gran mayoría neutrófilos y células de descamación del epitelio secretor de la glándula. El aumento de células somáticas se puede asociar con la disminución en la vida de anaquel de la leche fluida. Este fenómeno se debe principalmente a la acción de enzimas proteolíticas, las cuales

en gran parte son termoestables, permaneciendo activas después del proceso de pasteurización generando un sabor amargo en la leche almacenada; por otro lado, están las enzimas lipolíticas que predisponen un sabor rancio debido a la ruptura de los ácidos grasos de cadena corta. (De los Reyes *et al.*, 2010)

La mastitis subclínica suele ser causada (70 a 90% de los casos) por bacterias grampositivas con forma de cocos (especialmente *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae*), que se transmiten de un animal a otro durante el ordeño. Infecciones producidas por enterobacterias y *Actinobacillus pyogenes* casi siempre se presentan en forma clínica, esporádicamente, y son de menor importancia desde el punto de vista higiénico, porque normalmente se descarta la leche de estos animales. (Feitosa *et al.*, 2018)

Con relación a la evaluación de las características microbiológicas de la leche, la prueba de reductasa y el CTB (conteo total bacteriano) constituyen las técnicas tradicionalmente empleadas en la industria láctea. La primera ha sido utilizada principalmente para la leche que se entrega en perolas y el CTB para la leche entregada a granel. La prueba de reductasa se utiliza como indicador de la carga total de microorganismos y presenta como principio, la decoloración provocada por la acción enzimática microbiana sobre la leche adicionado de solución de azul de metileno, resazurina o cloruro de trifeniltetrazoleo. El tiempo necesario para esta decoloración es inversamente proporcional al número de bacterias presentes en la leche. Por otro lado, El CTB determina directamente el número de microorganismos presentes en la leche, expresados en unidades formadoras de colonias (UFC x mL). En condiciones ideales de ordeña higiénica el CTB inicial de la leche cruda se encuentra en torno de 1000 a 9000 UFC x mL. (Feitosa *et al.*, 2018). En México, el rango óptimo de mesófilos aerobios en placa para leche cruda de vaca no debe de exceder de 100,000 UFC/ ml para ser una leche de clase 1, mientras que una leche de clase 4 sus límites se encuentran de 750,000 a 1,000,000 de UFC/ml (NMX-F-700-COFOCALEC-2004).

Los métodos indirectos reflejan alteraciones en la composición de la leche debidas a la inflamación, midiendo distintos aspectos de la secuencia de cambios que tienen lugar cuando la glándula está infectada por un organismo patógeno. Dentro de los métodos indirectos, los más frecuentemente utilizados son la medición de la conductividad eléctrica (CE) y el recuento de células somáticas (RCS). La medición de la CE de la leche fue propuesta como una técnica de alta eficacia para la detección de la mastitis ya desde 1942. Los conductímetros detectan la alteración de la composición iónica de la leche causada principalmente por la inflamación de la glándula mamaria, manifestada por un aumento de la

concentración de sodio y cloro, con un consecuente incremento de la concentración iónica total (Elizalde, *et al.*, 2009)

Inicialmente, los patógenos que causan mastitis pueden aumentar el conteo total bacteriano (CTB), de la leche que se entrega a la industria. Esto es particularmente importante en establos lecheros que presentan alta prevalencia de enfermedad causada por *Streptococcus agalactiae* y *S. uberis*; además de que otras bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* pueden generar toxinas termo resistentes que representa un riesgo considerable a la salud pública. (De los Reyes *et al.*, 2010)

El producto extraído de la vaca debe llegar al local de almacenamiento (centro de acopio) con una carga microbiana variando entre 500 a 10 000 UFC x ml. Se recomienda entonces, enfriar la leche a 4 °C, dentro de las dos primeras horas después de la ordeña. En los casos en que se utiliza el sistema de tanque de expansión, la temperatura de la leche mezclada no debe pasar 10 °C, llegando al máximo de 4 °C en una hora (De los Reyes *et al.*, 2010)

Aunque la leche contiene inhibidores bacterianos naturales como la lisozima, la lactoferrina y el sistema lactoperoxidasa-tiocianato, los efectos que se producen por la acción microbiológica también están determinados por la interacción de las bacterias con el medio que las rodea. De esa manera, el control de uno o varios factores contribuye a prolongar la vida útil de la leche; en otras palabras, la acción bacteriana modifica el medio y este a su vez, determina cuáles son las bacterias que pueden proliferar (Carrillo *et al.*, 2016; Sarmiento, 2007). En la Tabla 1.4-2, se muestran las características que modifican ciertas bacterias en la leche

La presencia de microorganismos psicrófilos que crecen a temperaturas de refrigeración pueden multiplicarse en el tanque de almacenamiento antes de su procesado. Estos microorganismos tienen una actividad lipolítica (bacterias propiónicas y butíricas) y proteolítica (bacterias proteolíticas tipo *Pseudomonas*) (Feitosa *et al.*, 2018)

Las bacterias psicrotróficas se multiplican a bajas temperaturas (por debajo de 7 ° C), aunque la temperatura óptima de crecimiento es entre 20 y 30 ° C. Los principales géneros de bacterias psicrotróficas que se encuentran en la leche son: *Achromohacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (Gram-negativos) y *Bacillus* y *Clostridium* (Gram-positivo). Estas bacterias se eliminan mediante pasteurización, pero algunas enzimas, producidas por bacterias Gram-negativas y esporas, producidas por bacterias Gram-positivas, son resistentes al calor y causan problemas. (Feitosa *et al.*, 2018)

Los dos grupos de enzimas más importantes producidos por Las bacterias psicrotróficas son proteasas y lipasa, ellos pueden actuar en la leche cruda, mientras que las bacterias almacenadas y psicrotróficas son si multiplicando, y también en la leche que ha sido pasteurizada, (Feitosa *et al.*, 2018)

Tabla 1.4-2. Principales microorganismos que afectan las propiedades de la leche (Tomado y adaptado Sarmiento, 2007).

Microorganismo	Producto metabólico	Defecto producido
Bacterias psicrótrofas <i>Bacillus Cererus</i>	Péptidos amargos	Amargor
Bacterias psicrótrofas	Ácidos grasos libres	Ranciedad
	Ésteres de etilo	Afrutado
<i>Bacillus sp.</i>	Desestabilización de la caseína	Coagulación
Bacterias lácticas	Ácido láctico y acético	Acidificación
	3-metil butanal	Malteado
	Exopolisacáridos	Viscosidad

Las proteasas son las enzimas que causan el mayor impacto económico negativo en la industrialización de la leche. Actúan directamente sobre la caseína y provocan un sabor amargo en la leche o los productos lácteos.(Feitosa *et al.*, 2018) Las principales bacterias psicrotróficas productoras de proteasas son las pseudomonas. Las bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, cuando están presentes en grandes cantidades (10^7 a 10^8 UFC / ml), producen una enzima que es responsable de la gelificación de la leche esterilizada por el sistema UHT. Algunas cepas de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, cuando están presentes en grandes cantidades (alrededor de 10^7 CFU / ml), producen suficientes proteasas para degradar la caseína β y kappa. (Feitosa *et al.*, 2018)

La lipasa es responsable del sabor rancio de la leche o los productos lácteos. La lipasa descompone la grasa de la leche, liberando ácidos grasos de cadena corta (butírico, caproico y caprílico) que imparten un sabor y olor rancios a la leche. La leche cruda tiene lipasa natural, que actúa de forma espontánea. Esta actividad varía según el grado de agitación a la que se somete la leche después del ordeño y transporte. Las principales bacterias responsables de la producción de lipasa en la leche cruda pertenecen al género *Pseudomonas*. La pasteurización inactiva la lipasa natural de la leche, pero no completamente la producida por

bacterias. La lipasa producida por *Alcaligenes viscolatis* en la leche cruda resiste la pasteurización y es responsable de la rancidez del queso. (Feitosa *et al.*, 2018)

Las bacterias presentan distinta habilidad para reducir el azul de metileno, así el *Streptococcus liquefaciens*, los gérmenes del grupo coliaerógenos y los de la putrefacción (*Bacillus subtilis*) se muestran muy activos. Las células somáticas presentes en la leche también influyen mucho en la velocidad de decoloración, sobre todo los leucocitos. (Periago, 2012)

Capítulo 2.

2.0 Métodos para la conservación de la leche.

Tratamientos térmicos	Tratamientos no térmicos
<ul style="list-style-type: none">• Pasteurización• Esterilización (UHT)• Deshidratación• Ohmnización• Refrigeración• Congelación• Radiofrecuencia• Inducción electro magnética• Termización	<ul style="list-style-type: none">• Sonicación• Aditivos• Conservación con CO2• Ionización• Altas presiones hidrostáticas• Altas presiones por homogeneización• Pulsos eléctricos de alto voltaje• Campos magnéticos oscilantes• Plasma no térmico• Bactofugación• Microfiltración

2.1 Tratamientos térmicos

Uno de los objetivos principales de los tratamientos térmicos convencionales es inactivar cualquier microorganismo patógeno en la leche, al mismo tiempo que prolonga su vida útil reduciendo las cargas microbianas de bacterias de deterioro y la actividad enzimática. Al combinar el tiempo y la temperatura, la vida útil de la leche se puede prolongar desde 2 semanas en condiciones de refrigeración hasta un par de años si las condiciones de envasado y el tratamiento térmico son lo suficientemente fuertes como para lograr un entorno casi estéril. Desde un punto de vista microbiológico, el producto final cumple con todos los requisitos legales y es seguro para beber; sin embargo, la principal desventaja de la

pasteurización comercial es la degradación de los componentes de calidad y propiedades nutricionales del producto, debido al intenso tratamiento térmico y la posterior destrucción de proteínas y vitaminas, incluidos cambios indeseables en otras características como el sabor y el color. Para minimizar tales desventajas de los tratamientos térmicos a base de calor, al mismo tiempo que se garantiza la calidad microbiológica del producto, se han probado algunas nuevas tecnologías basadas en diferentes factores de conservación como alternativas a los tratamientos tradicionales (Barbosa *et al.*, 2010).

Dentro de las ventajas y desventajas que se tienen en común en los tratamientos térmicos en la leche, se pueden conseguir los siguientes:

- Destrucción de microorganismos o descenso en su crecimiento
- Inactivación de enzimas.
- Modificación de algunas estructuras como proteínas que influyen en la textura del producto acabado
- Generar productos de reacción Maillard (Jeantet *et al.*, 2005).

2.1.1 Refrigeración.

El mejor sistema actualmente para la conservación de la leche sigue siendo la refrigeración. Éste término es referido por la NOM-243-SSA1-2014 como un “método de conservación físico con el cual se mantienen los productos a una temperatura máxima de 4°C (280°K) que se emplea para inhibir el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, reducir las reacciones bioquímicas y el deterioro propio de los alimentos”. La temperatura ideal que debe de alcanzar la leche es de 4°C en el menor tiempo posible, permitiendo el almacenamiento en tanques isotermos o su embarque directamente a las cisternas isotermas del camión (Calvet *et al.*, 2016).

Para acelerar los procesos de enfriamiento en la leche, son usados los sistemas de pre-enfriamiento. Éstos son sistemas que permiten enfriar la leche antes de que llegue al tanque. Disponen de tubos con agua fría que enfría la leche a una temperatura entre 18°C a 23°C. Pre-enfriar la leche tiene como objetivo ahorrar electricidad y agua (Calvet *et al.*, 2016).

Mecanismo de acción

La eficacia de refrigeración para mantener una óptima calidad de la leche depende de 4 factores:

- Temperatura de conservación: Una temperatura menor a 4°C restringirá el crecimiento de microorganismos mesófilos, lo que derivará en menor descomposición de la leche
- Periodo de almacenamiento: El almacenamiento prolongado conlleva a la rancidez de la leche por oxidación de las grasas
- Velocidad de enfriamiento. Mientras la temperatura de la leche se mantenga por arriba de los 4°C, las bacterias mesófilas permanecerán activas, lo que se verá reflejado en el aumento de UFC/ml
- Contaminación inicial. Dependiendo de la carga bacteriana con la que inició la leche, ésta será la vida de anaquel que podrá tener el producto, además de las toxinas termoresistentes que (Calvet *et al.*, 2016).

La temperatura mínima se puede explicar en función de:

- Un descenso de la fluidez de la membrana, de modo que se detienen los procesos de transporte de nutrientes y el gradiente de protones;
- Un aumento de la viscosidad del citoplasma;
- Un debilitamiento de los enlaces hidrófobos de las proteínas (debido a cambios físicos en la estructura del agua de solvatación) que provoca inactivación de enzimas alostéricos y de actividad funcional de los ribosomas. En muchos casos los polisomas no se ensamblan.

En principio, el efecto del frío detiene o frena el crecimiento y proliferación bacteriana, pero depende en gran medida de la carga microbiológica inicial. (Jimenez, 2012)

Durante la fermentación de la lactosa por bacterias, también hay otras fermentaciones que dan lugar al sabor y aroma característico de la leche agria. Los cuidados higiénicos adoptados durante y después del ordeño influyen en el desarrollo de esta acidez, especialmente en las condiciones de conservación y temperatura. Cuando la leche se mantiene a baja temperatura (de 0 a 4 ° C), se reduce la multiplicación de bacterias capaces de transformar la lactosa en ácido láctico. (Feitosa *et al.*, 2018)

Desde que la leche llega al tanque refrigerante de la granja, la leche cruda se mantiene a baja temperatura y la microbiota predominante es de carácter psicrófilo, constituido principalmente por microorganismos Gram-negativos, los cuales secretan hidrolasas sobre los ésteres de

glicerol, incrementando el número de ácidos grasos volátiles, generando rancidez en la leche. (ver Tabla 1.4-1) (Early, 2000).

Sistemas de enfriamiento

Algunos de los sistemas de enfriamiento que se tienen son:

- Isotermos: Permiten almacenar la leche una vez enfriada con cualquier sistema de refrigeración previo.
- Enfriador compacto (*Chiller*): Permite enfriar instantáneamente o pre-enfriar la leche, dependiendo de su flujo, además que elimina el calor de la leche y permite ser usado para otros fines como el calentar agua de lavado.
- Enfriadores de placas: La leche transfiere el calor del agua al glicol (compuesto utilizado como refrigerante) contenido en las placas por el contacto.
- Enfriador por balsa y acumulador de hielo: Permite almacenar la energía en forma de hielo para poder ser usada en el enfriamiento instantáneo de la leche. Los acumuladores de hielo funcionan como un *Chiller*, donde se usa un líquido refrigerante.
- Sistema de agua helada de Packo: El sistema permite almacenar una gran cantidad de hielo y garantiza una alta capacidad de intercambio de calor.

Ventajas y desventajas del enfriamiento

La principal desventaja de la refrigeración, radica en la selectividad del tratamiento. Evitando o retardando el crecimiento de microorganismos mesófilos pero no de la misma forma con los psicrófilos. Esto da pauta a que la leche pueda desarrollar algunas características indeseables en el producto como pueden ser rancidez o amargor en la leche; sin embargo, es a la fecha una de las tecnologías más utilizadas en la actualidad debido a su bajo costo tanto de operación como de equipo, como acceso a ésta tecnología.

La refrigeración afecta a las caseínas en el equilibrio micelar y, por tanto, a la micela. Las interacciones hidrófobas juegan un papel importante en la asociación de caseínas que participan en la formación de las submicelas. Estas interacciones, cuando baja la temperatura, se traducen en una solubilización de las caseínas, particularmente la beta-caseína. Es importante señalar que la betacaseína se encuentra esencialmente incluida en las submicelas; la principal causa de la disolución de la beta-caseína es que las fuerzas hidrofóbicas, que son las causas que mantienen unidas las submicelas, son más débiles a

baja temperatura. Por tanto, no sorprende que las otras caseínas también se disuelven, aunque en menor extensión (las alfa-S-caseínas menos); como las enzimas proteolíticas atacan mucho más fácilmente la caseína cuando está en estado de disolución a bajas temperaturas, la plasmitta ataca más rápidamente la beta-caseína. La desintegración de las micelas por el frío puede también deberse a la disolución de una parte del fosfato cálcico coloidal. La asociación de iones calcio con la alfa-S-1-caseína disminuye al descender la temperatura, igual que con las otras caseínas. La pérdida de fosfato cálcico coloidal reduce probablemente la atracción de las submicelas y debilita la unión de moléculas individuales de caseína en una submicela; todos los cambios que se producen en las micelas modifican las propiedades de la leche, por ejemplo, la viscosidad aumenta significativamente con la refrigeración, la estabilidad coloidal de las micelas es mucho mayor y, por tanto, la leche coagula con dificultad. (Jimenez, 2012)

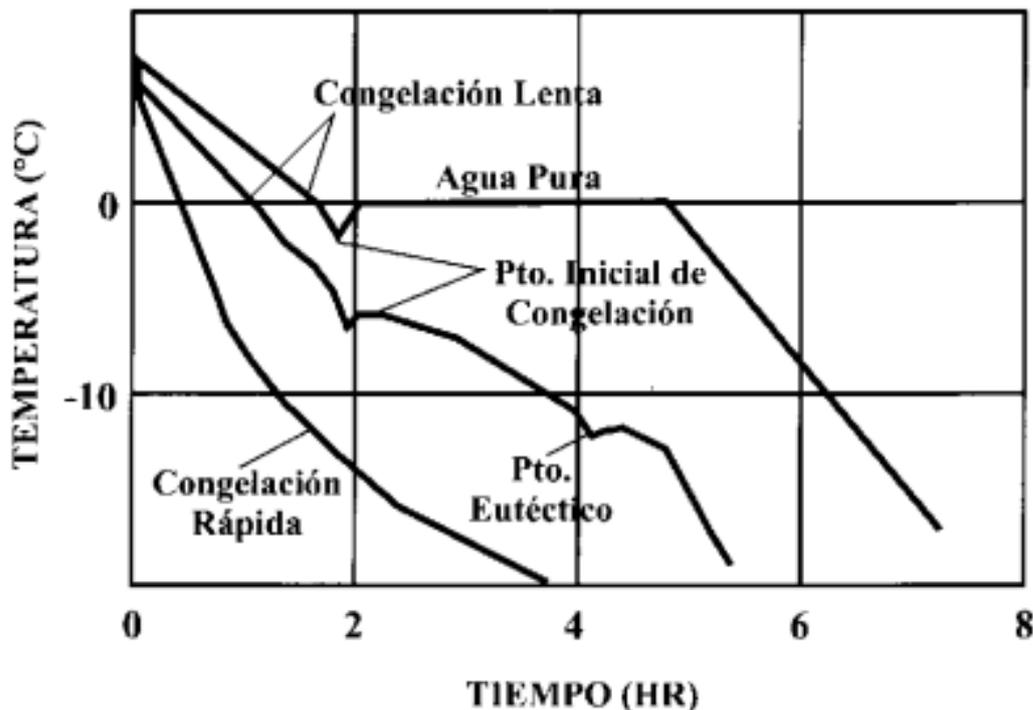
La refrigeración provoca un aumento de los contenidos en calcio y fosfato inorgánico solubles procedentes de las proteínas y de las micelas. Esto está ligado al aumento del fosfato cálcico soluble a baja temperatura, entonces, en la leche conservada 48 horas a 4 °C, el aumento de calcio soluble es del 10-20% y del fosfato del 8-10%. El paso de la fase soluble de la beta-caseína y fosfato cálcico da lugar a una disminución del tamaño de la micela y al aumento de su grado de hidratación en un 35% (después de 48 horas a 4 °C), siendo la fase coloidal más estable; estos efectos son reversibles mediante termización. El contenido de caseína soluble en una leche conservada 48 horas a 4 °C es del 15-16%, de la cual el 60% es beta-caseína. En la conservación de leche en refrigeración se produce un aumento de la gamma-caseína y de las proteosapeptonas, debido al paso de la plasmina (proteasa nativa) de la fase micelar a la fase soluble, lo que da lugar a una activación de la enzima y a la solubilización de la beta-caseína. Este efecto es irreversible, no teniendo incidencia tecnológica si la leche se conserva en refrigeración menos de 48 horas; a temperatura. (Jimenez, 2012)

2.1.2 Congelación

La congelación el período durante el cual, la temperatura del material es más o menos constante (cambio de fase) si la sustancia es pura. Antes de iniciar la congelación puede existir un ligero subenfriamiento seguido de un incremento de temperatura hasta el punto de fusión o congelación del material. Luego que los materiales se congelan por completo, sigue un descenso de temperatura aproximadamente lineal, causado por el retiro de calor sensible del producto sólido, fase que concluye cuando el material alcanza la temperatura del medio refrigerante o congelador utilizado para el proceso. Para el caso de un alimento, que como

una aproximación puede considerarse como una solución acuosa, la temperatura en la que comienzan a aparecer los primeros cristales de hielo, la temperatura está siempre por debajo de la del punto de fusión del agua. Se puede presentar un sub- enfriamiento como en el primer caso, pero el cambio de fase se hace con temperatura variable, cristalizando inicialmente sólo agua pura hasta un punto en el que se comienzan a formar los cristales del "soluto" (o del alimento o solución concentrada), lo que nuevamente causa un pequeño salto en la temperatura, conocido como punto eutéctico, seguido por una "meseta" de congelación (se ha dibujado horizontal, pero generalmente es curva) que finaliza en un punto generalmente difícil de determinar, en donde se considera que el producto está completamente congelado. Inicialmente sólo aparecen cristales de hielo puro; esto ocurre a la temperatura de inicio de la congelación. A medida que prosigue la congelación llega un momento en el que ya comienzan a formarse cristales de soluto + agua en cierta concentración llamada eutéctica, que es característica del alimento. Pueden existir varios puntos o temperaturas eutécticas, según la complejidad de la composición del alimento. En la Figura 2.1.2 se esquematiza este proceso. (Orrego, 2018)

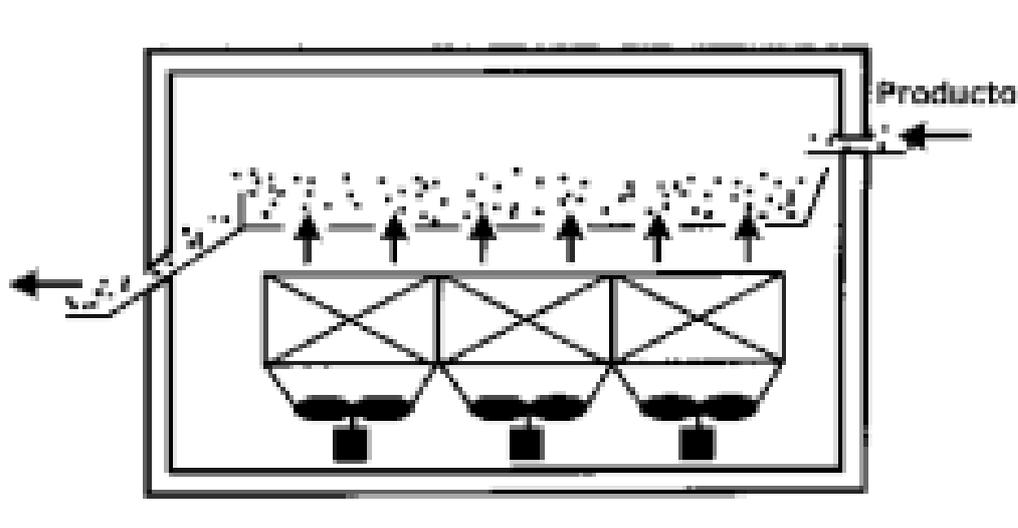
Figura 2.1.2-1. Visión esquemática de los procesos de congelación del agua y de un alimento (Orrego, 2018)



En este proceso primero se verifica la eliminación del calor sensible por enfriamiento y luego se retira el calor latente durante la congelación, que es la porción energética más

considerable; pueden presentarse otros efectos térmicos como el calor de disolución de sales, aunque casi siempre son muy pequeños. Seguidamente se elimina el calor latente de congelación, lo que provoca la formación de cristales de hielo; también se retira el calor latente de otros componentes de los alimentos, como el de las grasas. (Orrego, 2018)

Figura 2.1.2-2. Esquema de Congelador continuo de leche (Orrego, 2018)



Mecanismo de acción

La efectividad de éste método se relaciona con la disminución de la actividad fisicoquímica y bioquímica del alimento, la disminución de las reacciones enzimáticas y no enzimáticas, además de que a temperaturas por debajo de los -18°C el crecimiento microbiano se ve detenido. La congelación de los alimentos ralentiza, pero no detiene, las reacciones fisicoquímicas y bioquímicas que gobiernan el deterioro de los alimentos. Durante el almacenamiento, se produce un cambio lento y progresivo en la calidad organoléptica. La pérdida de calidad de los alimentos congelados. (Shafiur *et al.*, 2013)

Depende principalmente de la temperatura de almacenamiento, la duración del tiempo de almacenamiento y el procedimiento de descongelación. El crecimiento microbiano se detiene por completo por debajo de -18°C , y los cambios enzimáticos y no enzimáticos continúan en tasas mucho más lentas durante el almacenamiento congelado. El proceso de congelación reduce el movimiento aleatorio y la reorganización de las moléculas en la matriz. La congelación implica el uso de bajas temperaturas y las reacciones tienen lugar a velocidades más lentas a medida que se reduce la temperatura. La presencia de hielo y un aumento en la concentración de solutos pueden tener importantes efectos sobre las reacciones y el estado

de la matriz. La influencia final de la temperatura en las reacciones químicas debidas a la congelación podría agruparse como:

- a) Estabilidad normal: se produce una disminución de la temperatura en una velocidad de reacción más lenta, por lo tanto una mejor estabilidad cuando se almacenan los alimentos.
- b) Estabilidad neutra: la temperatura no influye en la velocidad de reacción
- c) Estabilidad inversa: una disminución de temperatura resulta en un aumento de la velocidad de reacción.

Independientemente del tipo de sistema acuoso, la concentración durante la congelación hace que la porción descongelada sufra cambios marcados en las propiedades fisicoquímicas como la iónica fuerza, pH, viscosidad, actividad del agua, tensión superficial e interfacial y potencial de oxidación-reducción. Es importante tener en cuenta que el oxígeno se expulsa casi por completo de los cristales de hielo a medida que se forman. se revisaron tres tipos de daño celular por congelación: daño osmótico, daño inducido por solutos y daños estructurales. (Shafiur *et al.*,2013)

En el enfriamiento lento, el hielo se forma lentamente en las celdas externas. Si hay suficiente tiempo, el agua de las células migra por presión osmótica. Esto da como resultado el encogimiento de las células y algunos daños en la membrana. Esta agua no vuelve a las células al descongelarse debido al daño de la pared celular, y la consecuencia es la pérdida por goteo. La concentración del soluto aumenta a medida que avanza la congelación. Por lo tanto, altas concentraciones de soluto de la matriz descongelada, en particular con alto contenido de sal, puede causar daño a muchos componentes de la celda polimérica y puede matar la célula. Este efecto de concentración está presente independientemente de si la congelación es rápida o lenta. (Shafiur *et al.*,2013)

Los crioprotectores, como los azúcares, generalmente se agregan a la fase acuosa para reducir el daño inducido por la sal. Además del efecto de concentración, la formación de hielo dentro de la célula puede causar daño al delicado orgánulo y la estructura de la membrana de la célula. Como consecuencia, se pueden liberar sistemas enzimáticos, lo que da lugar a una variedad de efectos, incluida la producción de sabores desagradables. Esto se puede prevenir blanqueando, un tratamiento térmico previo a la congelación que desnaturaliza las enzimas. Es posible diseñar y controlar un proceso de congelación conveniente a través del conocimiento de los mecanismos de daño para cada alimento en particular. En general, la conservación por congelación dista mucho de ser perfecta, y es necesario conocer este hecho si se van a desarrollar técnicas para superar las deficiencias conocidas y asegurar que este método siga siendo competitivo con los otros métodos principales. Un enfoque estratégico de

la calidad (mejora de la calidad) puede proporcionar una mayor tasa de éxito para los nuevos productos alimenticios congelados. La mejora de la calidad del producto y la reducción de energía o el aumento de la eficiencia del proceso son cuestiones importantes relacionadas con el proceso de congelación. (Shafiur *et al.*,2013)

Efecto sobre microorganismos

La congelación de la leche puede alterar la pared celular de las bacterias, perjudicando su capacidad de multiplicación, reduciendo la supervivencia de las cepas lácticas, sin embargo, puede haber aumentos aparentes en los recuentos provocadas por la separación de los aglomerados de bacterias durante, el almacenamiento. En consecuencia, debe añadirse a la preparación altas concentraciones de estas bacterias para compensar las pérdidas de células causadas por la congelación y lograr mantener el contenido bacteriano. Técnicas de atrapamiento de células en materiales poliméricos, tales como alginato de calcio utilizadas en helados, permiten la protección de las cepas lácticas durante el derretimiento e incrementan su sobrevivencia. (Cousillas *et al.*, 2012)

Ventajas y desventajas del congelamiento

La congelación de la leche puede tener efectos adversos en la calidad, así como también en sus propiedades fisicoquímicas, de composición y sensoriales, tales como separación de la grasa, floculación de las proteínas y desarrollo de sabor desagradable. Estos graves inconvenientes se disminuyen efectuando una congelación rápida de los productos, pero esto exige una mayor inversión en equipamiento para su procesamiento. (Cousillas *et al.*, 2012)

Uno de los grandes problemas de la congelación de la leche es la inestabilidad proteica que se caracteriza por la floculación, es decir, la agregación física de las micelas de caseína. Esa precipitación es dependiente de la temperatura, pero también está relacionada al tratamiento térmico al cual fue sometida la leche antes de la congelación. La estabilidad proteica de la leche congelada, depende principalmente de la que presenta la leche original. La congelación puede traer alteraciones en el sistema coloidal y la mayoría de estas se deben a la inestabilidad fisicoquímica de la leche, que cuando se congela, puede presentar separación de grasa y coagulación proteica. La inestabilidad proteica evidenciada por la descongelación y formación de un coagulo puede dispersarse con agitación mecánica y calor. En cuanto a las proteínas, la congelación puede alterar la estructura de ellas en la leche y el queso destruyendo los puentes de hidrogeno de los polipéptidos y por ende, reduciendo su capacidad de retención de agua. La congelación como método de conservación no altera las

características microbiológicas de la leche y el producto, inmediatamente después del descongelado, tiene una calidad similar a la leche de la que se originó. Sin embargo, la congelación puede tener efectos negativos sobre las células bacterianas que han demostrado ser sensibles a este proceso debido a las lesiones que las bajas temperaturas producen en la membrana y en el ADN bacteriano. Los procesos de congelación y descongelación afectan más a las células fagocitarias que a las células procariotas, por que ocasionan la lisis celular con la consecuente liberación de las bacterias intactas que seguirían manteniendo su capacidad de crecimiento en los cultivos sucesivos. Se observó que la congelación y almacenamiento de la leche durante una semana no altero la acidez de la leche de cabra, además que el almacenamiento de leche por medio de la congelación con un máximo de 60 días no alteraba la acidez de la leche. (Cousillas *et al.*, 2012)

Tratamientos como la homogenización y el almacenamiento en frío aumentan los niveles de lipólisis. La congelación puede romper la emulsión de grasa debido a la presión durante el proceso. En tanto, la homogenización previa a la congelación puede prevenir esta separación. La inestabilidad en general, no ocurre por la congelación en sí, sino que está directamente relacionada con el tiempo y temperatura a la que se realiza la misma. Cuanto menor es la temperatura, menor es la desestabilización. Durante el almacenamiento en frío la congelación se puede dar una oxidación de la leche de modo que se incrementa el contenido de ácidos grasos libres y por tanto la rancidez de la leche, especialmente si la lipasa no fue inactivada previamente por tratamiento térmico. (Cousillas *et al.*, 2012)

Los ácidos grasos de la leche congelada se oxidan y degradan fácilmente causando mal sabor a la misma. Estos cambios no solo afectan la vida útil del producto, sino también el rendimiento y la calidad de los productos lácteos como queso y yogur; sin embargo, otros autores expresan que este procesamiento no provoca grandes modificaciones en el sabor ni en el olor de la leche, pero sí puede ocurrir una floculación de las proteínas, perjudicando la apariencia y aceptación del producto. (Cousillas *et al.*, 2012)

La razón de la reducción del porcentaje de la grasa láctea durante el almacenamiento en congelación es debido a que los cristales que se forman durante la congelación destruyen los glóbulos de grasa, por otro lado, la ruptura enzimática de los triacilglicéridos, de la grasa durante el tiempo de almacenamiento congelado. (Cousillas *et al.*, 2012)

2.1.3 Termización.

Debido a que las centrales productoras de leche y pequeños productores, no pueden pasteurizar todo el producto inmediatamente, aplican un proceso llamado “termización”. La termización es un tratamiento térmico que se usa para prolongar el tiempo de almacenamiento de la leche antes de someterla a algún tratamiento térmico como pasteurización, UHT, o esterilización. Se aplica en las 36 horas posteriores a la ordeña, teniendo una concentración máxima de 3×10^5 UFC/ ml. (Alcántara, 2013).

Mecanismo de acción

Consta de un calentamiento de la leche de 57-68°C durante un tiempo de 15 - 30 segundos. Una vez realizada la termización y enfriando la leche de 0 – 1°C, el tiempo de almacenamiento de la leche puede prolongarse hasta 7 días sin pérdidas de la calidad. La termización, promueve la germinación de esporas bacterianas y por ende de formas vegetativas, con lo que el tratamiento de pasteurización, se consigue una mayor destrucción de bacterias esporuladas que cuando se aplica directamente (Early, 2000; Alcántara, 2013).

Ventajas y desventajas de la termización

Este proceso permite almacenar los productos sin refrigeración lo que resulta en una gran ventaja, sin embargo, tiene consecuencias negativas sobre la composición de los mismos que afectan considerablemente sus propiedades benéficas. El efecto negativo principal de la termización es destruir los microorganismos lácticos y enzimas en las leches fermentadas. Este proceso provoca una marcada reducción en los productos, de las vitaminas y compuestos aromáticos sensibles al calor. Mientras que los factores antimutagénicos sintetizados en el yogur por las cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, cuya eficacia ha sido demostrada in vitro, pierden su efecto después de la termización del producto a 55 °C. Por otra parte, la formulación de los productos fermentados sometidos a termización difiere de aquellos productos fermentados no tratados. Una diferencia clave es la inclusión de estabilizadores para proteger la caseína durante el tratamiento. Algunos aditivos o estabilizadores pueden ser adicionados antes de la fermentación (gelatina, almidón, agar-agar, algunas pectinas), pero otros se adicionan después de la fermentación (galactomanos, carrágenos, pectinas). (Cortada et al., 2008)

Los productos lácteos fermentados que son sometidos a la termización contienen entre 0,1 y 0,5 % de agentes estabilizantes. La termización reduce la viabilidad y actividad de las bacterias acidolácticas y no puede garantizar la preservación de las propiedades beneficiosas asociadas con los microorganismos vivos. La actividad de la β galactosidasa es severamente reducida y la absorción de la lactosa no tiene el mismo nivel de eficacia. Esto también conlleva el riesgo de deteriorar sustancias termolábiles tales como algunos agentes aromatizantes, pero también aquellos que contribuyen a estimular actividades bactericidas, antimutagénicas o respuestas inmunes. Después de la termización, las leches fermentadas tienen una durabilidad mayor, pero un detrimento de sus características beneficiosas para la salud. (Cortada *et al.*, 2008)

2.1.4 Pasteurización.

El Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos de Estados Unidos (NACMCF), define la pasteurización como “cualquier proceso, tratamiento, o combinación de ambos, que es aplicado a los alimentos para reducir el microorganismo más resistente de importancia para la salud pública a un nivel al que no es probable que represente un riesgo para la salud pública bajo condiciones normales de distribución y almacenamiento” (Lara, 2015). Por otro lado, la NOM-243-SSA1-2010, define a la pasteurización como “tratamiento térmico al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos.” El proceso ha sido designado para destruir la mayoría de los patógenos más resistentes no formadores de esporas que se encuentran en la leche cruda (Pereda, 2009). En otras palabras, la pasteurización tiene como finalidad la destrucción de formas vegetativas de algunos microorganismos (principalmente psicrófilos y mesófilos, pero no un grupo de termófilos), mediante el uso de calor a diferentes temperaturas y tiempos.

Mecanismo de acción

Los efectos de las altas temperaturas sobre las bacterias son

- Desnaturalización e inactivación de proteínas
- Colapso de la membrana citoplasmática

El calor provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidativos irreversibles en los microorganismos

El calor húmedo produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones:

- El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas (DNA, RNA, proteínas, etc) son producidas por reacciones que eliminan agua. Por lo tanto, reacciones inversas podrían dañar a la célula a causa de la producción de productos tóxicos. Además, las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas se estabilizan mediante uniones por puentes de hidrógeno intramoleculares que pueden ser reemplazados y rotos por el agua a altas temperaturas.
- El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire. Por lo tanto, los materiales húmedos conducen el calor mucho más rápidamente que los materiales secos debido a la energía liberada durante la condensación.

Los objetivos que se buscan en la pasteurización son:

- Destrucción de microorganismos para mejorar la calidad higiénica y prolongar la vida de anaquel del producto.
- Inactivación de algunas enzimas para mejorar la estabilidad del producto durante su almacenamiento.
- Modificar la estructura de proteínas para influir en la textura del producto acabado (Jeantet *et al.*, 2005).

Tabla 2.1.4-1 Tipos de pasteurización y relación tiempo-temperatura usada en cada una. (NOM-243-SSA1-2010)

NOMBRE	TEMPERATURA	TIEMPO
Pasteurización lenta	63°C	30 minutos
Pasteurización rápida	72°C	15 segundos

Ventajas y desventajas de la pasteurización

A pesar de que tradicionalmente la leche se trata térmicamente para garantizar la seguridad microbiológica, los tratamientos térmicos también influyen sobre la actividad de las enzimas provocando una activación o inactivación enzimática reversible o irreversible. La mayoría de las enzimas endógenas de la leche tienen efectos negativos sobre las propiedades organolépticas y nutricionales de la leche, por lo que uno de los principales objetivos de los tratamientos térmicos suele ser lograr la inactivación de dichas enzimas. La actividad residual de las enzimas de la leche es un buen indicador de la eficacia del tratamiento térmico, siendo visualizada principalmente por la inactividad de la fosfatasa alcalina, pero a su vez preservando la peroxidasa (Jeantet *et al.*, 2005; Pereda, 2009). De igual forma, por su mismo

mecanismo de acción, puede generar reacciones de Maillard las cuales alteran las características organolépticas del producto original.

2.1.5 Esterilización (UHT).

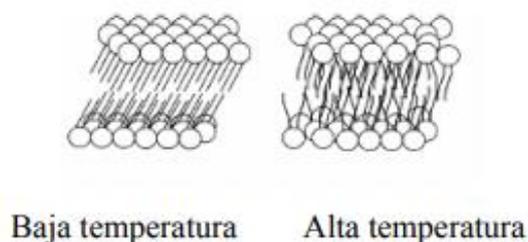
Se puede definir a la esterilización o UHT (por sus siglas en inglés Ultra High Temperature) como “tratamiento térmico aplicado al producto para la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la salud pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración” (NOM-243-SSA1-2010).

Los tratamientos de esterilización, en envase y UHT, buscan eliminar todos los microorganismos patógenos y la mayoría de los microorganismos de deterioro, incluyendo las esporas. Las condiciones del tratamiento térmico para obtener leche esterilizada se basan en una reducción de la microbiota termofílica en 9 logaritmos (Pereda, 2009).

Mecanismo de acción

La esterilización térmica destruye a los microorganismos en forma gradual; es por esto que no hay un único mecanismo de acción, sino más bien la suma de distintos eventos que se van sucediendo a medida que aumenta la temperatura. Aunque el efecto final de la esterilización es la desnaturalización y coagulación de las proteínas, son importantes otros. (Vignoli, 2008). El primer efecto letal sería la producción de rupturas de cadena única en el ADN que provocarían la muerte celular por activación o liberación de enzimas con actividad de endonucleasas. A medida que aumenta la temperatura se agregaría la pérdida de la integridad funcional de la membrana citoplásmica, por cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana y conductividad eléctrica, lo que produciría interferencias en el intercambio con el medio externo (Figura 2.1.5-1) (Vignoli, 2008, Silva, 2009), los procesos respiratorios y la síntesis proteica. Por último, las temperaturas más elevadas activarían ribonucleasas, que degradando el ARNr- producen la pérdida de viabilidad de las células expuestas. (Vignoli, 2008).

Figura 2.1.5-1. Inactivación bacteriana por cambios en la estructura de la membrana bacteriana expuesta a altas temperaturas, por cambios en la permeabilidad y conductividad eléctrica de la membrana (Tomado de Silva, 2009).



Efecto sobre microorganismos

La esterilización contempla la destrucción de microorganismos esporulados como son *Clostridium perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. Botulinum*, *Bacillus subtilis* y/o *B. cereus*. Para éste procedimiento se utilizan dos combinaciones de tiempo y temperatura. En la Tabla 2.1.4 se muestran diferentes combinaciones de tiempo y temperatura sugeridas para la esterilización de leche.

Tabla 2.1.5-1. Tiempos y temperaturas de esterilización en leche (Tomado y adaptado Jeantet *et al.*, 2005, NOM-243-SSA1-2010)

Temperatura	Tiempo
120°C	20 minutos
140°C	4 segundos
135°C - 149°C	2-8 segundos

Las temperaturas empleadas en procesos de pasteurización con ultra altas temperaturas (UHT), inducen a que se genere la reacción de Maillard, formado complejos de lactulosa-lisina que son los responsables de alterar el color y sabor de la leche (Alcántara, 2013). La esterilización a 140° por 4 segundos, permite limitar las pérdidas de tiamina, lisina y la coloración debido a la reacción de Maillard. (Jeantet *et al.*, 2005)

Ventajas y desventajas de la esterilización

Dentro de las ventajas que tiene la pasteurización por altas temperaturas son que es de rápido calentamiento y penetración genera destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo, no deja residuos tóxicos, hay un bajo deterioro del material expuesto y es económico; por otro lado, éste es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos, además de que se debe de tener

especial cuidado ya que un exceso en el tiempo de tratamiento, éste generará características indeseables. (Jeantet *et al.*, 2005)

2.1.6 Deshidratación.

Para la elaboración de leche deshidratada, primeramente, se debe de obtener una leche concentrada, también conocida como leche evaporada. Se define la leche evaporada como el producto obtenido mediante eliminación parcial del agua de la leche por el calor o por cualquier otro procedimiento que permita obtener un producto con la misma composición y características de la leche sin modificación en la proporción entre la caseína y la proteína de la leche (NOM-243-SSA1-2010), Ésta debe contar con un 45-48 % de sólidos, obtenida previamente con un calentamiento. Esta concentración es necesaria para la obtención de un producto de grano más pesado, economizando energía. La concentración de la leche se lleva a cabo mediante una evaporación del agua al vacío. Se emplea el vacío para eliminar el agua a bajas temperaturas (45-50°C) y así evitar el deterioro que podría sufrir la leche al ser tratada a altas temperaturas, a presión normal y tiempos prolongados, requeridos para evaporar entre un 50-80% de agua. Posteriormente, la leche es dividida en finas partículas por medio de un proceso de atomizado que, en contacto con el aire caliente, se secan (Keating, 1999).

Mecanismo de acción

El calor seco produce desecación de la célula, efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos, procesos oxidativos y fusión de membranas. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos. La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad de agua del medio es baja. Esto se debe a que las proteínas se estabilizan mediante uniones por puentes de hidrógeno intramoleculares que son más difíciles de romper. (Vignoli, 2008).

Una de las características del granulo de polvo obtenido por atomización, es el de la formación de una película de lactosa en el exterior que le confiere una resistencia más grande a la oxidación, especialmente en la leche con grasa, conservándose de 4 a 10 meses (Keating, 1999).

La calidad bacteriológica de la leche en polvo depende directamente de varios factores, como son:

- Estado de higiene del equipo.

- La temperatura de precalentamiento.
- La temperatura de deshidratación.
- Calidad higiénica de la leche cruda (Keating, 1999).

El número de microorganismos presente en la leche en polvo no debe de exceder de 50,000 UFC por gramo para leche precalentada a 74°C y para leche precalentada a 88°C no debe exceder de 20,000 UFC por gramo, aunque en la práctica el número de microorganismos por gramo de leche no excede de 1,000 UFC (Keating, 1999).

Métodos de secado.

- **Secado de tambor**

Una delgada capa de leche es secada a lo largo de un metal cilíndrico rotatorio o “tambor”, el cual es calentado internamente. La capa secada es raspada del interior y molida.

- **Secado en espuma**

Se inyecta aire o nitrógeno a presión a la leche concentrada y la mezcla obtenida es calentada al vacío. Posteriormente se forman celdas de gas, las cuales se tornan en una masa esponjosa que posteriormente pueden ser secadas rápidamente.

- **Secado por congelación.**

Una delgada capa de líquido es congelada, posteriormente el hielo es sublimado por alto vacío. La pieza restante con forma de pastel, es molido.

- **Secado en spray**

Éste es el método más común. Principalmente se desarrolla en 3 formas.

- Aire caliente. Se hace pasar aire por tuberías de vapor a una presión de 9 atmósferas con temperaturas de 175°C y sale a una temperatura de 100°C.
- Atomización del concentrado en el aire. El concentrado es calentado y se atomiza a presión o por centrifugación en la cámara de secado.
- Mezcla aire caliente y líquido atomizado. Es la combinación de ambos métodos. La leche concentrada es atomizada hacia la cámara de secado, impulsada por aire caliente. (Walstra *et al.*, 1999)

Ventajas y desventajas de la deshidratación

Dentro de las ventajas que tiene el calor seco es que no es corrosivo para metales e instrumentos y permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles. Por otro lado, requiere mayor tiempo debido a la baja penetración del calor. (Vignoli, 2008).

Por otro lado, en el caso de secado por tambor, hay varios daños al producto debido a que el raspado no es perfecto y los restos se vuelven a humedecer y a recalentar. Para el secado en spray y congelación, una de sus principales desventajas es el aspecto económico, ya que el equipamiento necesario tiene un alto costo; sin embargo, La deshidratación provee una forma de preservar la leche por mucho tiempo con mínimos cambios organolépticos. (Walstra *et al.*, 1999)

2.1.7 Inducción electromagnética - microondas.

Las microondas pueden clasificarse como un proceso electrotérmico para la pasteurización de alimentos. En el tratamiento por microondas se usa la emisión de energía en niveles de frecuencia comprendidos entre 300 MHz y 300 GHz que provocan la fricción de las moléculas por los cambios alternos en la orientación de las mismas, lo que induce a un aumento de la temperatura del alimento que conduce a la destrucción microbiana (Alcántara, 2013).

Las frecuencias de microondas están cerca de las frecuencias que se encuentran en las ondas de radio, televisión y radar; como resultado, cada país tiene sus propias especificaciones y se le asigna una frecuencia permitida para uso comercial en microondas para evitar interferencias con las comunicaciones. En América del Norte hay dos frecuencias de microondas aprobadas, 915 y 2450MHz (Barbosa *et al.*, 2010).

Mecanismo de acción

Un generador de alta frecuencia crea ondas y las guía hacia un horno que contiene el alimento a tratar, evitando que las ondas salgan de la cámara. La penetración en los alimentos depende de la longitud de onda, la profundidad del material, el tipo de producto (composición, estructura, propiedades dieléctricas y geometría) y la temperatura. Este tipo de energía puede ser absorbida por materiales que contienen agua u otras sustancias orgánicas, como el carbono. Cuando la energía ingresa al alimento, los dipolos moleculares intentan alinear la

orientación del campo eléctrico; comenzando a oscilar y generando calor en los alimentos, lo que lleva a un proceso de secado. Es debido a éste calor generado, que el efecto sobre los microorganismos es similar al efecto observado para la inactivación celular mediante el procesamiento térmico convencional, es decir, la desnaturalización de proteínas y pared celular; por lo que, una de las principales desventajas de utilizar la energía de microondas para pasteurizar los alimentos es la desigualdad en la distribución de la temperatura durante todo el proceso (Barbosa *et al.*, 2010).

Los mecanismos bajo los que la energía que se disipa del sistema de microondas son: la polarización de agua libre, la polarización de agua unida, la polarización de Maxwell-Wagner y la conductividad iónica. Cuando un campo eléctrico es aplicado a algún material dieléctrico, las cargas de éste se alinean con sus cargas opuestas; es decir, las cargas positivas son orientadas hacia el electrodo negativo viceversa, dándose una redistribución de las cargas y obteniendo un estado de equilibrio de las mismas. A esto se le llama “*Polarización dieléctrica*”, la cual es la responsable del éxito en el tratamiento por microondas. Ésta polarización dieléctrica consta principalmente de dos factores:

- 1. Constante dieléctrica. Está relacionada a la distribución del campo magnético en el material, mostrando que tan eficientemente la energía es aplicada al material y/o que tan bien el material puede ser polarizado; es decir, que tanto calor puede producir el material cuando es tratado por radiación de microondas.
- 2. Factor de pérdida dieléctrica. Representa la pérdida de las interacciones, las cuales miden cómo la energía es disipada en el material (Barbosa *et al.*, 2010).

Para los productos alimenticios tratados a 2,45 GHz, las propiedades dieléctricas están relacionadas con la concentración volumétrica de agua y la conductividad iónica; es decir, los materiales dieléctricos son mejores absorbentes y transmisores de las ondas de microondas. Otro factor a tomar en cuenta es la temperatura, ya que tiene un efecto sobre las propiedades dieléctricas de los alimentos, porque el factor de pérdida dieléctrica y la constante dieléctrica disminuyen a medida que aumenta la temperatura. De igual manera, el contenido de sal o azúcar en el medio es un factor importante que tiene un efecto en la constante dieléctrica y en el factor de pérdida dieléctrica del alimento (Barbosa *et al.*, 2010).

Efecto sobre microorganismos

En leche, algunos autores han reportado reducción de microorganismos patógenos en hasta 5 reducciones logarítmicas en leche de vaca, así como la inactivación de fosfatasa alcalina

como en los métodos convencionales de pasteurización por calor. Las muestras de leche tratadas con microondas a 2450 MHz han demostrado la inactivación de *L. monocytogenes* en menos de 35 segundos. En el caso del Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos de los Estados Unidos (NACMCF), aprueba el uso de microondas (71°C durante 10 min) para inactivación de *Listeria monocytogenes* en leche cruda, obteniendo como resultado la inactivación completa de dicha bacteria (Vásquez, 2015).

Ventajas y desventajas de la inducción electromagnética

Se ha observado que las muestras tratadas con microondas poseen una mejor calidad sensorial con respecto a las muestras de leche tratadas con UHT, teniendo una vida de almacenamiento mayor y sin la formación de sabores por reacción Maillard, obteniendo valores nutricionales muy parecidos a los de leche cruda incluso en almacenamiento por 4.5 días; sin embargo, el uso de inducción electromagnética se encuentra aún no es muy usada debido a que no se encuentra precisada sus límites máximos permitidos (Barbosa *et al.*, 2010).

2.1.8 Calentamiento óhmico.

El calentamiento óhmico, también llamado “*Ohmnización*” o “*Electro-calentamiento*”, es un tratamiento térmico a altas temperaturas en un periodo de tiempo corto (HTST); el cual se basa en el paso de corriente eléctrica alterna a través de los alimentos, los cuales ofrecen una resistencia a su paso, produciendo un incremento de temperatura, así los alimentos se calientan hasta lograr el efecto térmico esperado. Esta tecnología está limitada para aplicarse sólo a alimentos líquidos muy viscosos o con partículas sólidas en suspensión (Alcántara, 2013; Barbosa *et al.*, 2010).

Mecanismo de acción.

Debido a que la generación de calor y la distribución de la misma a través del alimento es extremadamente rápida, por lo que el alimento retiene su sabor original y una mejor integridad de partícula comparada con los tratamientos térmicos convencionales. El calor producido al instante por el paso de la corriente eléctrica es el cuadrado de la corriente inducida en el alimento, la conductividad eléctrica y el tipo de comida que es calentada. La conductividad

eléctrica es influenciada por la cantidad de iones en el alimento. Para aumentar la efectividad del tratamiento, la conductividad puede ser mejorada a través de la electro-ósmosis, es cual se consigue aplicando un campo de corriente alterna. En un medio como un alimento se puede generar suficiente calor para inactivar las células bacterianas. Por otro lado, parte del mecanismo de acción de la ohmización en la inactivación de microorganismos, también está relacionado con el proceso de la electroporación. Las bajas frecuencias en el tratamiento (50 – 60 KHz), son los responsables de la inactivación de los microorganismos por la acumulación de cargas en las paredes celulares y con ello la formación de poros (Barbosa *et al.*, 2010). En el capítulo 2.2.7 se hablará más a detalle sobre el fenómeno de electroporación; sin embargo, el daño permanente de la membrana se relaciona con las descargas de alto voltaje, mientras que con el bajo voltaje no se entiende completamente el efecto destructor. Algunos estudios sobre levaduras sugieren que el uso de corriente alterna de bajo voltaje podría generar la formación de sustancias tóxicas, como el cloro libre o el peróxido de hidrógeno, que podría ser la causa de la muerte celular (Barbosa *et al.*, 2010).

Efecto sobre microorganismos

Se han realizado estudios sobre la inactivación de *Streptococcus thermophilus* en leche descremada procesada por calentamiento óhmico a tres diferentes condiciones de proceso (70°C/30 min, 75°C/15 min y 80°C/1 min). Los autores reportaron que *Streptococcus thermophilus* se inactivó más rápidamente en la leche procesada con calentamiento óhmico en comparación con el tratamiento térmico tradicional a las mismas condiciones de temperatura y tiempo; además que no se observaron cambios significativos en la cantidad de proteína en la leche procesada (Vásquez, 2015)

Ventajas y desventajas del calentamiento óhmico

Dentro de las ventajas que se pueden mencionar sobre el calentamiento óhmico se tiene:

- Calentando material alimenticio por generación interna de calor sin la limitación de la transferencia de calor y algo de la no uniformidad comúnmente asociada con el calentamiento por microondas debido a penetración dieléctrica asociada.
- Una mayor temperatura en las partículas que en el líquido puede ser lograda, lo que es imposible para los sistemas de calentamiento convencionales.
- Reduce los riesgos de contaminación de la superficie de transferencia de calor y quemado del producto alimenticio, resultando en daños mecánicos mínimos y mejores nutrientes y retención de vitaminas.

- Alta eficiencia de energía, cerca del 90% de la energía eléctrica es convertida en calor.
- Almacenamiento por Ambiente/Temperatura favorable y distribución cuando es combinado con sistema de empacado aséptico.
- Facilidad de controlar el proceso con switch para encender y apagar
- Reducción en los costos de mantención (sin muchas partes móviles)
- Sistema amigable con el medio ambiente.
- Como no hay superficies calientes para transferencias de calor, hay poco riesgo de daño al producto debido a quemadura.
- Se pueden lograr altas temperaturas rápidamente, por ejemplo, temperaturas para procesamiento UHT. (Olea, 2015)

Desventajas

- La conductividad eléctrica de los alimentos, y de mezclas de alimentos, podría depender de: componentes iónicos (sal), ácidos y la movilidad del contenido de agua aumenta la conductividad eléctrica, mientras que las grasas y alcohol la disminuyen.
- Fluidos de más alta viscosidad muestran un procesamiento por calentamiento óhmico más rápido que los de viscosidad más baja.
- Densidad y calor específico del producto.
- Factores del proceso como Intensidad del campo eléctrico, tiempo de tratamiento, temperatura y tiempo de residencia.
- Factores microbiológicos como tipo de microorganismo, concentraciones y etapa de crecimiento
- Factores del medio como pH, compuestos iónicos, fuerza iónica del medio y conductividad. (Olea, 2015)

2.1.9 Radiofrecuencia.

La radiofrecuencia es otra técnica de calentamiento dieléctrico que es bastante similar a los principios de la tecnología de microondas.

En la calefacción por RF, el calor se genera dentro del producto debido a la fricción de las moléculas y los iones oscilantes como resultado de la aplicación de un campo eléctrico alterno. La calefacción por RF es influenciada principalmente por las propiedades dieléctricas del producto. El nivel de la frecuencia, la temperatura y las características del alimento

(viscosidad, contenido de agua y composición química) afectan las características dieléctricas y así la calefacción por RF en alimentos.

Mecanismo de acción.

El calor se genera dentro del producto, como resultado de la polarización de las moléculas y la migración de iones que se produce a alta frecuencia (13.56, 27.12 y 40.68 MHz). La ventaja de la radiofrecuencia sobre la energía de microondas es que la profundidad de penetración es mayor debido a la alta frecuencia.

Efecto sobre microorganismos

Estudios respecto a inactivación de microorganismos fueron reportados usando un calentador de 27,12 MHz de RF, observaron que, para un tiempo de residencia total de 55,5 s, fueron encontrados reducciones de 5 log para *Listeria* y 7 log para *E. coli*, a 1200 W y una temperatura de salida del tubo aplicador de 65°C aproximadamente. Este estudio demuestra que la calefacción del RF se podría utilizar para pasteurizar con eficacia la leche manipulando niveles de energía incidente y caudal. (Oblitas, 2018)

Se ha visto que la inactivación microbiana en la leche con radiofrecuencia, específicamente de los microorganismos *Listeria innocua* y *Escherichia coli* se inactivan mediante reducciones logarítmicas de 5 y 7, respectivamente, utilizando un dispositivo de 2 kW, 27.12MHz a 55 segundos (Barbosa *et al.*, 2010).

Ventajas y desventajas de la radiofrecuencia

La calidad alimenticia y particularmente la textura de algunos de los productos se ven afectadas. La calefacción con RF de productos al aire se ha encontrado ser irrealizables y por lo tanto es necesario rodear a los productos con agua caliente durante la cocción con RF. Una película de polietileno de alta densidad, que sostuvo el producto y permite la calefacción correcta facilita la circulación del agua del producto. Este estudio ha demostrado que 450 W de energía de RF podrían reducir tiempos de cocción a 7 minutos 40s con respecto a 33 minutos por cocción convencional, sin afectar la calidad del producto resultante con respecto a textura y a color. (Oblitas, 2018)

2.2 Tratamientos no térmicos

La aplicación de tecnología de procesamiento no térmico (NTP) está aumentando dentro de la industria alimentaria. La ausencia de calor en esta tecnología ofrece algunas ventajas, como que los atributos sensoriales y nutricionales del producto no se ven afectados, dando así productos de mejor calidad en comparación con los métodos de procesamiento tradicionales. La idoneidad de la tecnología para una determinada aplicación varía según la naturaleza del motivo y el propósito del procesamiento. Algunos NTP se han utilizado durante mucho tiempo en la industria alimentaria en el sudeste asiático, pero la mayoría aún se encuentran en la etapa inicial de investigación. A pesar de varios desafíos existentes, estas tecnologías tienen el potencial de ser adoptadas como una alternativa al procesamiento de productos alimenticios de valor agregado, especialmente ahora que las demandas de los consumidores y el comercio, así como la fortaleza económica de la región, están cambiando. (Adzahan *et al.*, 2007). Estas tecnologías incluyen campos eléctricos pulsados o de radiofrecuencia (PEF / RFEF), luz ultravioleta (UV), ultrasonido (EE. UU.), Luz pulsada (PL), procesamiento de alta presión (HP), radiación ionizante, dióxido de carbono de fase densa (DPCO₂) y ozono. Los procesos no térmicos más prometedores y más investigados parecen ser la alta presión hidrostática (HHP), los campos eléctricos pulsados (PEF) y los ultrasonidos de alta intensidad combinados con presión. Dentro los tratamientos alternativos a los térmicos se encuentran los campos de pulsos eléctricos y campos magnéticos oscilantes, irradiación, ultrasonidos, microfiltración, centrifugación, la alta presión hidrostática (HHP) y más recientemente la ultra alta presión homogenización (UHPH) (Pereda, 2009). La principal finalidad de las tecnologías desarrolladas para la conservación y/o transformación de alimentos y/o componentes alimenticios, es obtener productos seguros con calidad organoléptica, nutricional y microbiana aceptables, estos métodos pretenden ser equivalentes y desplazar en un futuro a los tratamientos térmicos (Alcántara, 2013). Se ha comprobado que estas nuevas tecnologías alargan la vida de diversos productos alimenticios y podrían en un corto o mediano plazo, reemplazar parcialmente los tratamientos térmicos convencionales existentes utilizados industrialmente para pasteurizar y/o esterilizar los alimentos (Silva, 2009)

2.2.1 Ultrasonido (Sonicación).

El desarrollo de aplicaciones del ultrasonido para la industria láctea ha incrementado como resultado de su aporte positivo a la efectividad de los procesos. El ultrasonido es definido como ondas de sonido con frecuencias por encima del umbral de audición humana (>16kHz).

Los efectos provocados por la sonicación se utilizan en aplicaciones como la ultrafiltración de suero (Lara, 2015). El término ultrasonido se refiere a las ondas sonoras que superan una frecuencia de 20kHz, con una longitud de onda de 145 mm y de alta frecuencia (Alcántara, 2013). Con la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia, el paso de las ondas de sonido a través de un alimento líquido provoca la vibración de las moléculas, generando miles de burbujas y produciendo efectos físicos en los alimentos y los microorganismos (Barbosa *et al.*, 2010).

MECANISMO DE ACCIÓN

Una vez que las ondas ultrasónicas pasan a través de un medio líquido, se produce un fenómeno conocido como “cavitación acústica”, que básicamente es la formación de miles de burbujas en el medio (Chandrapala *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2010). En este proceso la onda viaja por el medio en forma de una serie de ciclos de compresión (alta presión) y rarefacción (baja presión). Durante la rarefacción se forman vacíos o cavidades en el medio, las cuales absorben pequeñas cantidades de vapor disuelto, formando así las llamadas burbujas de cavitación. Estas burbujas continúan creciendo durante los ciclos sucesivos, ya que la cantidad de vapor que ingresa a la burbuja durante el ciclo de baja presión (rarefacción) es mayor a la cantidad de vapor que sale durante la compresión. Finalmente, cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber más energía, colapsan violentamente provocando así la cavitación. Los ciclos de implosión y explosión de las burbujas generan micro-corrientes y micro-tormentas. El colapso de dichas burbujas genera un calentamiento localizado de aproximadamente de 500 °C y presiones en el orden de 50 a 100 MPa (Lara, 2015; Barbosa *et al.*, 2010). La capacidad del ultrasonido para inactivar microorganismos se ha atribuido principalmente a los efectos de la cavitación acústica. Se ha reportado que éste fenómeno provoca el debilitamiento y el rompimiento de las células bacterianas a través de tres factores. El primero es el daño a la pared celular debido a efectos mecánicos provocados por los gradientes de presión generados en el colapso de las burbujas. El segundo son las fuerzas de cizalla generadas por micro-corrientes. Finalmente, el tercero es un ataque químico a la pared celular por parte de radicales libres y de peróxido de hidrógeno que se forman durante la cavitación como producto de la “sonólisis del agua”. Otro mecanismo importante es la cavitación intracelular, que se refiere a choques micromecánicos que afectan a los componentes estructurales y funcionales de la célula hasta causar la lisis celular (Lara, 2015).

La presencia de núcleos de gas disueltos o microburbujas en medios líquidos es la razón detrás de la generación de nubes de burbujas bajo la influencia de un campo de presión. La distribución de las burbujas en términos de tamaño, número de burbujas y su tiempo de vida antes del colapso se encuentra en función de la velocidad con que se disipa la potencia. (Gallegos, 2015)

La intensidad de la cavitación y, por lo tanto, la inactivación microbiana, depende de variables como la fuente del ultrasonido, la geometría del reactor, la frecuencia, la intensidad, la temperatura, la presión, la amplitud de la onda de ultrasonido y la composición de los medios. Además, la eficiencia de la inactivación se afecta por las propiedades del medio, tales como el volumen, temperatura, viscosidad y la concentración de gas disuelto. El tipo de bacteria también influye en la reducción, pues la sonicación ha mostrado ser menos efectiva en bacterias Gram-positivas posiblemente por tener una pared celular más robusta que las Gram-negativas.

Efecto sobre microorganismos

En cuanto a las pruebas realizadas específicamente con leche se han desafiado contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* y recuento total de coliformes (Lara, 2015). Por otro lado, se ha visto un aumento en la actividad antioxidante en la leche descremada cuando se le somete a sonicación debido a la acción de la cavitación (Barbosa *et al.*, 2010).

Ventajas y desventajas de la sonicación

Los resultados de los estudios realizados en muchas matrices hasta la fecha indican que la eficacia de la sonicación por sí sola para la inactivación microbiana es baja e insuficiente. Como resultado, se han diseñado procesos que combinan la sonicación con otras tecnologías como altas presiones (manosonicación), tratamientos térmicos (termosonicación), alta presión y temperatura (manotermosonicación), presión osmótica (osmosonicación) y luz ultravioleta (fotosonicación) con el fin de aumentar su eficacia (Lara, 2015).

Otras aplicaciones en el área de leche y derivados incluye: aplicación de ultrasonido a la leche para mejorar la textura e incrementar el rendimiento en quesos; aplicación de ultrasonido para aumentar el grado de hidrólisis en la producción de leche deslactosada; aplicación de ultrasonido dentro de congeladores de superficie raspada para la fragmentación de cristales

de hielo para obtener distribuciones de tamaño más homogéneo en la elaboración de helados; aplicación de 450 W, 20 kHz a la leche entera para obtener reducciones de tamaño de los glóbulos de grasa equivalentes a los de la homogeneización convencional (Chaudhari et al., 2015).

Dentro de las desventajas que se pueden encontrar en el uso de ultrasonido como método de conservación se encuentran:

- Amplitud máxima de transductores de escala industrial limitada
- Alto consumo de energía
- Largos tiempos de tratamiento
- Cambios sensoriales indeseables (Raso *et al.*, 2015)

2.2.2 Aditivos.

La NOM-243-SSA1-2010, define un aditivo como “cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de los productos y que actúe como estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad”

Aceites esenciales

El creciente interés en la sustitución de “conservantes alimentarios químicos” y productos con bajo impacto al medio ambiente, ha fomentado la investigación sobre la selección de materiales vegetales con el fin de identificar nuevos compuestos, antimicrobianos, así como también antioxidantes. Los compuestos fenólicos de los antimicrobianos naturales, son los responsables de su actividad antibacteriana. Éstos se encuentran en los aceites esenciales de diferentes especies de plantas (Silva, 2009).

En los alimentos se ha demostrado que se necesitan más cantidades de aceites esenciales que la que se ha necesitado en experimentos previos *in vitro*, lo cual se explica por factores intrínsecos del propio alimento como la cantidad de grasa, proteína, agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal y otros aditivos; y por factores extrínsecos, como la temperatura, pH, tipo de envasado, características del microorganismo e incluso la matriz física de los alimentos también puede limitar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (Cava, 2013).

Mecanismo de acción.

El modo de acción de los antimicrobianos naturales es similar al de otros compuestos fenólicos; los sitios de acción de estos en la célula bacteriana son: degradación de la pared celular, daño en la membrana citoplasmática, permeabilización de la membrana celular, daño en las proteínas de membrana, pérdida del contenido intercelular al exterior, coagulación del citoplasma y pérdida de la fuerza motriz de protones. Todos estos mecanismos de inactivación no actúan independientemente; algunos afectan a la célula bacteriana como consecuencia del daño anteriormente producido por otro mecanismo de inhibición. La estructura química de cada antimicrobiano natural afecta en su modo de acción y actividad antibacteriana (Silva, 2009).

La actividad antibacteriana de los antimicrobianos naturales varía de acuerdo con el tipo de microorganismo y se ve influenciada por la temperatura de almacenamiento del alimento. Las bacterias Gram-positivas son generalmente más sensibles a los antimicrobianos naturales que las Gram-negativas. Se ha reportado que altas concentraciones de antimicrobianos naturales prolongan considerablemente la fase exponencial de los microorganismos (Silva, 2009).

Ventajas y desventajas de los aditivos

A pesar del potencial de los aceites *in vitro*, su uso en alimentos se ha restringido debido a las altas concentraciones necesarias para conseguir suficiente actividad microbiológica. Aunado a lo anterior intenso aroma y sabor de los aceites esenciales, incluso a muy baja concentración pueden causar efectos sensoriales negativos que exceden el umbral aceptable del consumidor. Para evitar esto, se ha sugerido el uso de aceites esenciales en forma de nanoemulsiones (Cava, 2013).

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos de origen proteínico, producto del metabolismo secundario de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) y que, a bajas concentraciones presentan inhibición microbiológica, lo que les permite ser usadas en la conservación de los alimentos. La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación directa con la biomasa producida (Beristain *et al.*, 2012).

Entre sus características principales destacan el ser estables al calor y a pH ácidos, ambas propiedades están estrechamente relacionadas: es decir, un incremento de pH reduce su estabilidad al calor; sin embargo, aunque las bacteriocinas presentan relativa estabilidad a pH ácido o neutro, son fácilmente destruidas a pH mayor de 10. De igual manera, debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, incluyendo las de origen pancreático (α -quimiotripsina) y gástrico, debido a ello durante su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas, sin ser absorbidas como compuestos activos, resultando así inocuas para el consumidor (Beristain *et al.*,2012).

Las bacteriocinas se pueden clasificar de acuerdo al tipo de bacterias que la producen, la forma más común de clasificarlas es en dos grupos: Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativa y bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas. Dentro del grupo de las bacteriocinas Gram-Positiva, las bacteriocinas producidas por BAL son las más utilizadas dentro de la industria láctea (Sarmiento, 2007).

- **Clase I:** Lantibióticos; llamados así por contener aminoácidos modificados como Lantionina o β -metil Lantionina. Con un tamaño menor a los 5KDa. Este grupo a su vez se subdivide en lantibióticos del tipo A y B.
- **Clase II:** Bacteriocinas no modificadas, de pequeño tamaño y estables al calor. Es el grupo más numeroso y comprende las bacteriocinas de tamaño inferior a 10KDa, son termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura a diferencia de las bacteriocinas del tipo I.
- **Clase III:** Bacteriocinas no modificadas, de gran tamaño y sensibles al calor. Son las bacteriocinas de mayor tamaño (más de 30Kda). Termolábiles. Son las de menor interés industrial (Sarmiento, 2007).

Mecanismo de acción

El modo de acción de los lantibióticos se atribuye a la desestabilización de las funciones de la membrana citoplasmática, debido a la formación de poros en la misma.

Estos mecanismos pueden dividirse ampliamente en aquellos que funcionan principalmente en la envoltura celular y aquellos que están activos principalmente dentro de la célula, afectando la expresión génica y la producción de proteínas. (Cotter 2012)

- a) **Mecanismos asociados a la envoltura celular.** Los antibióticos del tipo A, grupo al cual pertenece la Nisina, además de algunas bacteriocinas de clase II, se dirigen al lípido II. El lípido II es un intermediario clave en la maquinaria de biosíntesis de péptidoglicanos dentro de la envoltura celular bacteriana. (Cotter *et al.*, 2012). La estructura de los péptidos de las bacteriocinas, α -hélice o β -láminar, pueden formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros. El lado apolar de la molécula se situará próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro. Como consecuencia, se observa una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de la membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular (Beristain *et al.*, 2012). Es importante destacar que la nisina y otras bacteriocinas se unen al lípido II en un sitio distinto del sitio de unión de la vancomicina y, por lo tanto, conservan la actividad contra los patógenos gram positivos resistentes a la vancomicina. Por lo tanto, al dirigirse al lípido II, estas moléculas inhiben la síntesis de peptidoglicano y, para algunos, este es el único mecanismo de acción. Otros antibióticos también pueden usar el lípido II como molécula de acoplamiento para facilitar la formación de poros en la membrana celular, lo que resulta en una pérdida del potencial de la membrana y, en última instancia, en la muerte celular. (Cotter *et al.*, 2012)
- b) **Inhibición de la expresión génica y producción de proteínas.** Las bacteriocinas pueden destruir sus células diana al interferir con el metabolismo del ADN, el ARN y las proteínas. Por ejemplo, MccB17 atraviesa la membrana externa a través de la porina OmpF y se transfiere a través de la membrana interna de una manera que depende de SbmA (un transportador de péptidos de la membrana interna). Luego, la bacteriocina funciona al inhibir el superenrollamiento del ADN mediado por la ADN girasa, lo que interfiere con la replicación del ADN. (Cotter *et al.*, 2012)

Otras bacteriocinas también dañan o matan las células diana a través de la formación de poros en la membrana celular. Por ejemplo, los péptidos de clase IIa y algunas otras bacteriocinas de clase II (como la lactococina y la microcina) se unen al sistema de manosa fosfotransferasa asociado a la envoltura celular (Man-PTS), que luego conduce a la formación de poros. Un subconjunto más pequeño de antibióticos, como la cinamicina y péptidos relacionados, funciona uniendo la fosfatidiletanolamina en las membranas celulares y, a su vez, inhibiendo la enzima fosfolipasa A2. (Cotter *et al.*, 2012)

Efecto sobre microorganismos

Los derivados de bioingeniería de los lantibióticos nisina, actagardina y nukacina ISK 1, así como los derivados de lacticina que se han generado in vitro, exhiben una actividad específica mejorada contra objetivos Gram-positivos y/o Gram-negativos. Las formas sintéticas de lactocina son más estables que su equivalente natural; y los híbridos de nisina-vancomicina son activos contra VRE. (Cotter *et al.*, 2012). En la leche, la nisina, proveniente de *Lactococcus lactis* previene la esporulación de bacterias termofílicas resistentes al calor que pueden sobrevivir a la pasteurización. Ésta usándose a razón de 250 mg/L. Por otro lado, la pediocina que pertenece a la clase II, es sintetizada vía ribosomal por bacterias lácticas del género *Pediococcus*, usada a razón de 30, 000 UI/ ml. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas mencionadas en leche es inhibir microorganismos como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y principalmente *Listeria monocytogenes* (Beristain *et al.*, 2012).

Ventajas y desventajas de las bacteriocinas

La alta termoresistencia en las bacteriocinas con peso molecular menor a 5 kDa, como la nisina, les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche, pero son parcialmente destruidas por arriba de los 100°C. Dicha estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como a la formación de enlaces cruzados estables (Beristain *et al.*, 2012).

2.2.3 Conservación con CO₂

Uno de los métodos (propuesto inclusive como alternativa a la termización) para inhibir la proliferación de psicrotrofos en leche cruda refrigerada y mejorar así su conservación, es su acidificación mediante inyección de CO₂. (Bada *et al.*, 2000) Consiste en un método para aumentar el periodo de conservación de la leche cruda refrigerada mediante inyección de CO₂ a la leche en los tanques de almacenamiento en refrigeración y posterior desgasificación por calor y vacío para restituir al producto sus propiedades organolépticas y destinarlo a su consumo como leche líquida (pasterizada, UHT, esterilizada) o a la elaboración de derivados lácteos. (Bada *et al.*, 2000)

Mecanismo de acción

El proceso consiste en la acidificación de la leche cruda refrigerada por inyección de CO₂ hasta un determinado pH. De esta manera se consigue incrementar al menos 4 días el periodo actual de almacenamiento y vida útil de la leche cruda refrigerada. Las concentraciones de CO₂ normalmente empleadas en leche corresponden a rangos de pH entre 6,0 y 6,5. Por otra parte el mantenimiento de un pH constante a lo largo del tratamiento, mediante inyección automática de CO₂ o ajuste de pH cada 24 horas, resulta mucho más efectivo que una única inyección inicial de gas. La acidificación a pH 6.2, con periódicos reajustes por burbujeo de gas, han probado ser eficientes para prolongar la conservación en frío en la leche cruda. La efectividad del CO₂ es mayor a bajas temperaturas y su potencialidad inhibitoria se ve incrementada al aumentar su concentración en leche. El grado de inhibición alcanzado depende también de la carga microbiana inicial, siendo más efectivo cuando los recuentos iniciales en leche son altos. (Bada *et al.*, 2000)

La desgasificación posterior tiene la doble finalidad de eliminar los sabores desagradables producidos por el CO₂ restituyendo en la leche sus características organolépticas iniciales y de minimizar asimismo el riesgo de coagulación y aumento de volumen del gas ocluido en la leche en las plantas de tratamiento térmico. El CO₂ residual no eliminado por la desgasificación alarga la vida útil de la leche pasteurizada por inhibición de los microorganismos supervivientes durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración (Fernandez, 2012)

La descripción del proceso es la siguiente:

- a) Acidificación de la leche cruda mediante inyección de CO₂: A la leche conservada en tanques de refrigeración y en agitación suave, se le inyecta CO₂ de grado alimentario de forma controlada y automática. El gas pasa a presión desde un depósito a la leche a través de una placa porosa de material inerte (acero inoxidable o sílice) situada en el fondo del tanque de refrigeración. La cantidad de CO₂ inyectada y el tiempo de inyección se controlan mediante una sonda de pH. Esta sonda está conectada a una válvula solenoide que abre o cierra el paso del gas en función de un intervalo de pH previamente programado.
- b) Desgasificación por vacío. Pasados los días de almacenamiento en refrigeración la leche se somete a una desgasificación en continuo por calor y vacío. Para ello la leche se calienta inicialmente a una temperatura prefijada de 30 a 50°C en un intercambiador de calor. Por bombeo mecánico pasa a un tanque desgasificador en

el cual existe una superficie cónica lisa por la que se derrama la leche en una fina película mientras se aplica un vacío entre 200 y 450 mm Hg. La leche desgasificada se bombea desde el fondo del tanque desgasificador a un depósito de almacenamiento o se introduce de nuevo en el intercambiador de calor donde se completa el proceso térmico que se desee realizar. (Bada *et al.*, 2000)

Ventajas y desventajas del uso de CO₂

Una de las ventajas del tratamiento de la leche cruda con CO₂ es que no ejerce efectos adversos sobre las caseínas, proteínas del suero, ácidos orgánicos, compuestos volátiles, y vitaminas hidrosolubles y liposolubles

No obstante, la excesiva concentración de CO₂ en leche puede producir efectos adversos como:

- Modificación de las propiedades sensoriales de la leche destinada a consumo como leche líquida.
- Inhibición de la producción de ácido láctico por parte de los cultivos iniciadores
- En la fabricación de quesos, excesiva dureza de la cuajada que dificulta su manipulación.
- Coagulación por excesiva acidez y aumento de volumen del gas ocluido en la leche durante el tratamiento térmico en las plantas industriales. la leche antes del tratamiento térmico. (Bada *et al.*, 2000)

2.2.4 Irradiación (Ionización).

Se define como radiación a la propagación y emisión de energía a través del espacio o la materia. La irradiación está relacionada con la propagación de la energía del espectro electromagnético. La aplicación comercial del tratamiento por irradiación ionizante en alimentos empezó en 1980, pero su éxito ha sido poco debido a las preocupaciones en cuanto al tratamiento por parte de los consumidores. La irradiación de alimentos se usa para describir el proceso en el cual la radiación ionizante se aplica a los alimentos. En los Estados Unidos, el término utilizado con más frecuencia ha sido "pasteurización electrónica", un proceso que intenta inactivar las bacterias con irradiación (Barbosa *et al.*, 2010; Silva, 2009).

La irradiación se concibe como un tipo de energía (suficiente para causar la ionización) que se transfiere al alimento. Existen tres fuentes de radiación ionizante utilizadas para procesar alimentos: rayos gamma, rayos X y haces de electrones. La cantidad de irradiación absorbida por el alimento es medida en kGy (1Gy = 1J/kg). Durante la irradiación de alimentos con radiación ionizante, una cascada de electrones secundarios con suficiente energía cinética genera la ionización de átomos y moléculas y con ello, la formación de radicales libres. En los alimentos con alto contenido de humedad, las especies químicas se forman a partir de la radiólisis del agua. Los tres efectos principales de la irradiación de los alimentos en general son la ionización, la disociación y la excitación. Cuando la energía pasa a través del alimento, el producto absorbe la energía, lo que genera los cambios deseables o indeseables en el alimento tras el proceso (Barbosa *et al.*, 2010; Silva, 2009).

Mecanismo de acción

El principal mecanismo de inactivación en la irradiación es el daño al ADN en las células. Dependiendo del propósito, la dosis requerida varía desde muy baja (por ejemplo, 1 kGy) hasta más de 10 kGy. Dependiendo de la dosis absorbida, la irradiación se puede clasificar como uno de los tres procesos: radicación, radurización y radappertización.

- En la radicación, el objetivo es reducir el número de bacterias y parásitos patógenos que no forman esporas. Las dosis bajas (inferiores a 0,4 kGy) utilizadas en este tratamiento son equivalentes a la pasteurización por irradiación.
- La radurización, se utiliza específicamente para mejorar la vida útil y las características de calidad de un producto. Las dosis rondan los 0,4 a 10 kGy.
- La radappertización, se utiliza para reducir el número y/o la actividad de los microorganismos a un número muy bajo, uno que no es detectable por métodos convencionales. Las dosis son de aproximadamente 10 a 50 kGy, lo que equivale a la esterilización por irradiación (Barbosa *et al.*, 2010).

Estudio sobre microorganismos

La irradiación se ha usado en leche para la inactivación los microorganismos patógenos en la leche y los productos lácteos. Dentro de los microorganismos patógenos que se han inactivado con esta tecnología están los géneros *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. con dosis inferiores a 10 kGy y *Escherichia coli* O157: H7 y *Staphylococcus aureus* con dosis medias de irradiación, aunque las toxinas de ésta última no se destruyen con la irradiación. Tampoco

hay una diferencia importante en la resistencia de las bacterias Gram-positivas o Gram-negativas y levaduras a la inactivación bajo irradiación, además que las esporas son resistentes a esta tecnología (Barbosa *et al.*, 2010).

Ventajas y desventajas de la irradiación

Los principales cambios químicos asociados con la irradiación de los alimentos resultan de la radiólisis del agua con la subsiguiente formación de radicales libres y la recombinación con otros compuestos químicos en el producto. Se han obtenido efectos similares con otras tecnologías de procesamiento de alimentos convencionales. La irradiación puede cambiar algunas de las propiedades físicas y químicas de la leche, como resultado de la desnaturalización, degradación, polimerización y reordenamiento de proteínas, vitaminas y carotenoides, así como la producción de hidroperóxido (Barbosa *et al.*, 2010).

Los efectos de la radiación gamma en las proteínas de la leche de vaca se han estudiado, aplicados a dosis de 3, 5 y 10 kGy, a temperatura ambiente y en presencia de aire. Bajo estas condiciones se ha visto que la solubilidad de las proteínas se redujo después del tratamiento de irradiación, lo que podría ser el resultado de la reticulación de las cadenas de proteínas. Sin embargo, dependiendo de la dosis de irradiación, algunos productos pueden desarrollar características no deseadas de sabor, color y sabor. Las dosis altas (alrededor de 45 kGy) aplicadas a la leche en condiciones de refrigeración pueden producir un sabor tostado y caramelizado, mientras que la temperatura ambiente puede producir la gelificación (Barbosa *et al.*, 2010).

La irradiación gamma se ha desarrollado e investigado y tiene un gran potencial para producir alimentos inocuos y nutritivos. Desafortunadamente, su desarrollo y comercialización se ha visto obstaculizado en el pasado por percepciones públicas desfavorables. Por otro lado, es más probable que el haz de electrones suceda a los rayos gamma a largo plazo, ya que no existe limitación en el suministro de materias primas como el cobalto-60. Es más caro en términos de costos iniciales, pero su rendimiento constante eclipsa a la irradiación gamma. (Adzahan *et al.*, 2007). Esta es una de las tecnologías con el menor de las características indeseables, siendo la Intensidad máxima limitada a una dosis de 10 kGy y pudiendo generar características indeseables en el producto final. (Raso *et al.*, 2015)

2.2.5 Altas presiones hidrostáticas.

La alta presión hidrostática (APH), también denominada pascalización, presurización o simplemente alta presión, es un tratamiento no térmico para la conservación de alimentos, que permite mejorar la seguridad microbiana de los productos sin que se produzca la pérdida de nutrientes, se generen compuestos potencialmente nocivos. (Tellez *et al.*, 2001)

En el sistema internacional de unidades, la presión se mide en pascales (Pa) que es equivalente a la fuerza total de un Newton actuando de manera uniforme sobre un metro cuadrado. La presión hidrostática es la presión ejercida por un fluido de manera perpendicular sobre el fondo del recipiente que lo contiene y sobre la superficie de cualquier objeto sumergido en él generado por el fluido en reposo. La alta presión puede generarse por tres formas distintas: compresión directa, compresión indirecta y calentamiento del medio presurizante, conocidos como métodos de presurización. (Alcántara, 2013).

La alta presión hidrostática (APH) se aplica en magnitudes a los alimentos de 100-1000 MPa de forma continua, durante un determinado lapso de tiempo que puede ir de 1 a 30 min y el volumen de la vasija, cilindro o cámara de presurización puede tener la capacidad desde algunos cm³ hasta 1 m³. Esta tecnología emplea agua como fluido transmisor de la presión, debido a su baja compresibilidad, de ahí que se les denomine tratamiento a altas presiones hidrostáticas. Las temperaturas de operación dependen del tipo de sistema, pero el intervalo varía generalmente entre -20°C y 80°C. La compresión puede incrementar la temperatura de los alimentos hasta 3°C por cada 100 MPa (Alcántara, 2013).

Además de la destrucción bacteriana, se ha demostrado que se mejoran las propiedades de cuajado y de coagulación ácida de la leche sin afectar sus características de calidad como sabor, olor, vitaminas y minerales. (Fernandez, 2012)

Los microorganismos se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de su tolerancia a las presiones:

- Barosensibles, crecen en el intervalo de 1-50 MPa.
- Barotolerantes, son capaces de crecer a 30-40 MPa.
- Barófilos, pueden crecer a presiones de 40-50 MPa.
- Barodúricos, sobreviven, pero no crecen a presiones de 50-200 MPa (Pereda, 2009).

Se ha observado que entre más compleja sea la estructura del microorganismo más sensible es a la presurización, de modo que las células eucariotas son más sensibles que las

procariotas. Los hongos y las levaduras presentan mayor sensibilidad que las formas vegetativas bacterianas, esto a presiones de 200-300 MPa, las células vegetativas pueden inactivarse a magnitudes de 400-600 MPa, en cuanto a las esporas pueden resistir presiones de 1000 MPa (Alcántara, 2013).

Mecanismo de acción

Dos principios rigen a la alta presión hidrostática,

- a) Principio isostático que consiste en aplicar una determinada presión a un material de manera homogénea e instantánea, evitando tener áreas sobre tratadas así como la deformación del producto.
- b) principio de Le Chatelier el cual establece que un aumento de la presión aplicada a un sistema con temperatura constante, induce un desplazamiento del equilibrio en el sentido de la reacción que produce una disminución de volumen. El principio de Le Chatelier permite predecir las modificaciones inducidas por la presión sobre las moléculas, si se conoce el cambio de volumen del proceso, se puede estimar si éste se favorece o no por la presión. (Zavala, 2012)

Primeramente, ocurre una ruptura de la pared celular, posteriormente debido a la formación de poros en ella, ocasiona un desequilibrio osmótico. Por otro lado, también hay desnaturalización de enzimas responsables del metabolismo bacteriano, alteración de mecanismos genéticos y se induce a la cristalización de los fosfolípidos de membrana. Cuando se aplica la presión varios sitios de la célula bacteriana pueden dañarse y la ATPasa de la membrana, conduciendo a una disminución en el pH celular, acidificando el interior de la célula (Pereda, 2009).

La inactivación de los microorganismos por la APH es debida a un incremento en la permeabilidad de la membrana, la inhibición de las reacciones productoras de energía y la desnaturalización de las enzimas esenciales para el desarrollo y reproducción de la célula. (Tellez *et al.*, 2001) Primeramente, ocurre una ruptura de la pared celular, posteriormente debido a la formación de poros en ella, ocasiona un desequilibrio osmótico. Por otro lado, también hay desnaturalización de enzimas responsables del metabolismo bacteriano, alteración de mecanismos genéticos y se induce a la cristalización de los fosfolípidos de membrana. Cuando se aplica la presión varios sitios de la célula bacteriana pueden dañarse y la ATPasa de la membrana, conduciendo a una disminución en el pH celular, acidificando el interior de la célula (Pereda, 2009).

El efecto de la alta presión sobre la viabilidad de los microorganismos es una combinación de varias acciones a) Cambios en la morfología de la célula, los cuales son reversibles a bajas presiones (300 MPa); b) Desnaturalización de proteínas a presiones altas debido al desdoblamiento de las cadenas peptídicas; c) Modificaciones que afectan a la permeabilidad de la membrana celular. (Tellez *et al.*, 2001)

El mayor grado de inactivación sobre los microorganismos se lleva a cabo en la etapa logarítmica de crecimiento. En general, los microorganismos Gram negativos son los más sensibles a las Altas Presiones; les siguen las levaduras y hongos, los Gram positivos y por último las esporas; los virus son muy resistentes a las altas presiones, aunque depende del tipo de virus. La mayoría de los autores coinciden en que las esporas bacterianas son las formas de vida más resistentes a la presurización. Presiones de 400 a 600 MPa inactivan las células vegetativas, mientras que para inactivar las esporas se necesitan presiones de hasta 1500 MPa a temperatura ambiente. (Tellez *et al.*, 2001)

Varios sistemas enzimáticos de los microorganismos son inhibidos o inactivados por la presión. Este es el caso de varias deshidrogenasas en *Escherichia coli* (100 MPa), carboxipeptidasas de las levaduras (400 MPa) y la ATPasa localizada en la capa de los fosfolípidos, involucrada en el fenómeno del transporte activo a través de la membrana. La actividad de la ATPasa Na⁺ /K⁺ de la membrana celular se reduce por la alta presión. Este efecto es debido a la bicapa asociada. Cuando se aplica la presión, varios sitios dentro de la célula bacteriana pueden dañarse y por lo tanto la ATPasa de la membrana no puede realizar su función, debido a la desnaturalización directa o por la dislocación de la membrana. El ATP ya no se hidroliza, y por lo tanto, ya no está disponible para llevar a cabo el transporte activo de protones, el pH celular se acidifica y la célula finalmente muere. Se ha observado una disminución en la síntesis del ADN a altas presiones. Ésta se relaciona con la inactivación de las enzimas implicadas en esa síntesis. La doble hélice del ADN permanece estable debido a que los enlaces de hidrógeno no se alteran con las altas presiones. La desnaturalización de las proteínas es irreversible por encima de 300 MPa (entre 100 y 300 MPa es reversible). Pero la replicación y transcripción del ADN, así como la síntesis de las proteínas, son inhibidas a niveles mucho más bajos de presión. Este fenómeno explica parcialmente la ausencia del desarrollo microbiano con los tratamientos de presiones antes mencionados. (Tellez *et al.*, 2001)

Las células son más resistentes a la presión cuando sus membranas son más rígidas. Células de *Lactobacillus plantarum*, cultivadas a 10⁰ C, mostraron una relación alta de ácidos grasos saturados/insaturados y un incremento en la resistencia a la presión. Esto puede ser debido

a un menor grado de cristalización de los fosfolípidos de la membrana en condiciones de alta presión cuando las células crecen a 10° C, pues la temperatura de fusión de los lípidos aumenta, de una manera reversible, en más de 10°C por cada 100 MPa. (Tellez *et al.*, 2001) Las bacterias en fase estacionaria son más resistentes a las APH que las células en fase exponencial. De igual forma, en general, las bacterias Gram-positivas son más resistentes a la alta presión que las Gram-negativas debido a su pared celular más gruesa (Alcántara, 2013).

La leche ha sido un producto presurizado, puesto que se ha demostrado que conserva sus propiedades nutritivas, sabor y aroma casi idénticos al natural haciendo que el consumidor tenga preferencia por éste tipo de producto. Se ha encontrado que la APH es eficaz para retardar la acidez de la leche reduciendo la población inicial de microorganismos con una eficacia similar a la pasteurización a 73°C/15 s. El efecto de la presión sobre el agua como componente de la leche está vinculado con el descenso del punto de congelación, lo que implica a establecer nuevos criterios en leche presurizada para prevenir prácticas fraudulentas. (Alcántara, 2013).

Efecto sobre microorganismos

Un contaminante frecuente en leche es *Listeria monocytogenes*. Una población de *L. monocytogenes* de 10⁶ UFC/mL fue inactivada por la exposición a 340 MPa a 23°C en leche ultrapasteurizada. Algunos investigadores (Rademacher *et al.*, 1998) consideran que la presurización de leche a 500 MPa durante unos minutos equivale a un tratamiento de pasteurización (72° durante 15 s), estos autores demostraron que tiempos superiores a 8 minutos presurizando entre 400 y 700 MPa no facilitaban la inactivación microbiana, la cual oscila entre 1 y 2.5 reducciones logarítmicas. (Tellez *et al.*, 2001)

La temperatura es muy importante para que el tratamiento de presurización sea efectivo. Células de *E. coli* O157:H7 se sometieron a tratamientos de alta presión a 200 MPa durante 30 min a 30° C. Las células una vez presurizadas, se sometían a temperaturas de 55, 58 y 60° C. Si esto se realizaba inmediatamente los resultados indicaron que el tratamiento de alta presión aumentaba la sensibilidad al calor de estas bacterias. Cuando los cultivos tratados por la alta presión fueron almacenados a 3° C, antes de someterlos a calentamiento, la sensibilidad al mismo persistió más de 10 días. Un estudio similar se realizó con *E. coli* O157:H7 en leche desnatada. También, se observó un incremento en la sensibilidad al calentamiento inmediatamente después del tratamiento con APH, pero tras almacenarla

durante 4 días a 3° C no hubo diferencias significativas en la termotolerancia entre las muestras presurizadas y las no presurizadas. (Tellez *et al.*, 2001)

Las altas presiones retardan las reacciones de fermentación, así, la leche no se agria en 12 días cuando se trata a 70 MPa y la aplicación de presiones de 1371 MPa durante 1 hora posponen la descomposición de la leche, que se puede consumir durante 4 días más. (Tellez *et al.*, 2001)

Tabla 2.2.5-1. Sensibilidad de algunos microorganismos y enzimas a altas presiones hidrostáticas en leche. (Tomado y adaptado Tellez *et al.*, 2001, Cantara, 2012)

Microorganismo	Alimento	Condiciones (Presión, T°, Tiempo)	Reducción logarítmica
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Leche UHT	800 MPa, 10 min	2
		600 MPa, 30 min	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche cruda	340 MPa, 60 min, 23°C	6
	Leche UHT	340 MPa, 80 min, 23°C	6
	Leche cruda	400-500 MPa, 10-15 min, 40-50°C	inactivación
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leche UHT	600 MPa, 30 min	2
	Leche pasteurizada	586 MPa, 3 ciclos de 1 min, 5°C	5
Esporas de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Leche UHT	600 MPa, 60 min, 70°C	4
<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>Paratuberculosis</i>	Leche cruda	500 MPa por 10min	4
Fosfatasa alcalina	Leche de vaca	300 MPa, 5 min, 63°C	Inactivación

Ventajas y desventajas de las altas presiones hidrostáticas

Ventajas

- El tratamiento evita la deformación de los alimentos, debido a que la presión se transmite uniforme e instantáneamente
- No produce deterioro de nutrientes termolábiles como por ejemplo vitaminas
- No se altera el sabor natural, ni la coloración del alimento, pues las altas presiones no favorecen la reacción de Maillard
- No precisa de la incorporación de aditivos al alimento

Desventajas

- El alto coste del equipo, inconveniente que es cada vez menos importante ya que se están desarrollando equipos cada vez más baratos.

- Con los equipos de APH disponibles hasta ahora en el mercado no se pueden diseñar procesos continuos
- -Imposibilidad de aplicación en algunos alimentos (frutas, verduras) porque perderían su forma y aspecto original.
- La desconfianza del consumidor a decidirse a comprar un producto “presurizado” por ser algo novedoso y desconocido.
- Mayor fatiga del metal
- Tiempos de ciclo largos
- Cambios sensoriales indeseables en alimentos no líquidos (Raso *et al.*, 2015)

2.2.6 Ultra altas presiones por homogeneización.

La homogeneización se define como el proceso de división de grandes glóbulos de grasa polidispersos de una emulsión aceite en agua en un gran número de glóbulos grasos pequeños de menor tamaño y de manera homogénea. Esta reducción homogénea del tamaño se logra forzando el paso a alta presión de las partículas suspendidas en el fluido a través de una válvula. Los homogeneizadores pueden estar equipados con dos válvulas conectadas en serie; una primera válvula de homogeneización que trabaja a mayor presión (conocida también como primera etapa), y una segunda válvula (o segunda etapa) que trabaja a presiones de homogeneización inferiores. (Mayta *et al.*, 2020)

La homogeneización es de especial interés en la industria láctea donde es usada desde hace años para reducir el tamaño del glóbulo graso con el fin de incrementar la estabilidad de la emulsión y evitar el desnatado y la coalescencia durante el almacenamiento. La tecnología ultra alta presión por homogeneización (UHPH) se basa en los mismos principios que la homogeneización convencional con la gran diferencia de que se pueden alcanzar presiones superiores a 200 MPa (Pereda, 2009).

Un homogeneizador de alta presión consiste de un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones elevadas. En cualquier tipo de válvula de homogeneización, el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula y luego se expande. El sistema de alta presión de un equipo UHPH consta de un par de intensificadores que trabajan con la ayuda de una bomba de alta presión. Dichos intensificadores están ensamblados a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de altas presiones (Pereda, 2009).

Mecanismo de acción

Durante el tratamiento de UHPH se aplica presión a un fluido que es forzado a pasar a través de una válvula causando así un incremento de la velocidad de flujo y una repentina pérdida de presión. De esta manera, las células experimentan una serie de fuerzas y se rompen a través de su interacción con el fluido y las paredes de la válvula (Pereda, 2009).

Entre los mecanismos de ruptura celular se encuentran: la repentina caída de presión, fuerzas de corte y de torsión, turbulencia y más probablemente la cavitación y las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de gas durante la aplicación de la UHPH. El incremento de temperatura alcanzado por el producto después de pasar por la válvula también puede tener un efecto destructivo sobre la inactivación microbiana (Pereda, 2009).

Factores que afectan la inactivación de microorganismos tratados por UHPH.

En general, son varios los factores que determinan el nivel de inactivación microbiana en el producto, entre los que destacan: la temperatura de entrada del producto, la presión de homogenización, la geometría de la válvula de homogenización el número de ciclos o etapas que se realicen sobre el fluido, la composición de la membrana celular, la forma de los microorganismo, los recuentos iniciales de microorganismos en el producto, la presencia de inhibidores microbianos o conservantes naturales, el tipo de matriz y las características fisicoquímicas del producto fresco. (Mayta *et al.*, 2020)

- **Tipo de microorganismo:** (forma y composición de la pared). Al aplicar presión se produce un aumento de la permeabilidad o la ruptura de la membrana celular, causando la muerte celular e impidiendo una regeneración o reactivación de la célula como ocurre con la alta presión hidrostática. La pared celular de las bacterias Gram-positivas es más rígida que la de las Gram-negativas. Esto se debe a la gruesa capa de peptidoglicanos constituida por una serie de cadenas de glicanos compuestos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces glicosídicos. En cuanto al efecto de la UHPH sobre la forma del microorganismo existen resultados muy contradictorios.
- **Temperatura de entrada de la muestra:** El estado físico de los lípidos y proteínas de la membrana celular está íntimamente relacionado con el efecto que pueda tener la presión sobre las células y depende fundamentalmente de la temperatura. A

temperatura ambiente, los lípidos en las membranas biológicas se encuentran en un estado líquido-cristalino que provee la máxima permeabilidad y flexibilidad. A bajas temperaturas (2-10°C) se produce la cristalización de los fosfolípidos y la membrana celular se vuelve rígida. Por el contrario, a temperaturas superiores a 40°C, los enlaces hidrofóbicos se debilitan dando menor resistencia a la membrana frente a la alta presión homogenización.

- **Tipo de matriz:** Se sugiere que, debido a que los componentes de la leche ofrecen protección hacia la alta presión homogenización. Se ha evaluado el efecto de la cantidad de grasa en la leche frente al tratamiento de UHPH observándose que tratamientos de UHPH en leche con distintos porcentajes de grasa mostraron diferentes niveles de reducción de la carga microbiana. También debe considerarse que, dependiendo de la matriz, la viscosidad del fluido será diferente, existiendo una relación inversamente proporcional entre la viscosidad y la inactivación microbiana, lo que podría explicarse por una menor cavitación y turbulencia en fluidos viscosos.
- **Nivel de presión y número de pases:** Los estudios de inactivación de diversos microorganismos (inoculados o propios), llevados a cabo sobre diferentes matrices y utilizando diferentes equipos de UHPH, han mostrado que al incrementar la presión y el número de pases se alcanza mayor inactivación microbiana. Esta mayor inactivación asociada con el aumento de número de pases del fluido a través del homogeneizador se debe principalmente a un efecto acumulativo del tiempo de residencia del fluido en la válvula de alta presión.
- **Carga inicial:** Se ha observado que, al incrementar la concentración inicial de microorganismo en la leche, por lo que se deben de aumentar los tiempos, o las presiones para conseguir la reducción de bacterias.
- **Inhibidores:** Actualmente existe un gran interés dentro de la industria alimentaria en utilizar compuestos antimicrobianos naturales como aldehídos, cetonas, ésteres o enzimas naturales. La UHPH y las enzimas antimicrobianas actúan de forma sinérgica sobre los microorganismos estudiados lo que puede deberse fundamentalmente a tres factores: el efecto directo de la presión sobre la integridad del microorganismo, la mayor facilidad de entrada de las enzimas a través de las membranas dañadas y un efecto indirecto del proceso sobre las moléculas de la enzima, es decir que, ya que la actividad de una enzima se debe a su estructura tridimensional, pequeños cambios

que afecten los sitios activos pueden inducir un aumento o disminución de su actividad (Pereda, 2009).

Varios autores han estudiado a lo largo de los últimos años la posible aplicación de la UHPH para lograr la inactivación de la microbiota nativa de la leche minimizando los efectos adversos del tratamiento térmico, sin embargo, a pesar de que la tecnología de UHPH es considerada una tecnología alternativa a los tratamientos térmicos, durante el proceso de alta presión homogenización se produce un marcado incremento de la temperatura del producto debido al incremento de presión que ocurre en el intensificador y en la tubería situada antes de entrar a la válvula que generan una compresión del fluido y a las fuerzas a las que es sometido el fluido al pasar por la válvula de alta presión y a la conversión de energía cinética en energía térmica. No sólo se ha demostrado que existe un incremento lineal de la temperatura con el incremento de la presión, sino que también se ha observado un incremento de la temperatura con el incremento de la temperatura de entrada (Pereda, 2009).

Efecto sobre microorganismos

Se ha evaluado la población de la microbiota de la leche sometida a UHPH (300 MPa) a T_i (del inglés temperature inlet) de 4 y 24 °C, concluyendo que tanto la presión de homogenización y las T_i influyen en la inhibición de la microbiota de la leche de 1 a 3 ciclos logarítmicos. Por otro lado, Pereda et al. (2009) reportaron reducciones en la población de coliformes, enterococos y lactobacilos de 3 y 4 ciclos logarítmicos en muestras de leche tratadas por UHPH (300 MPa) con $T_i = 30$ y 40 °C, en comparación a las leches tratadas por métodos convencionales. Zamora et al. (2012) observaron una reducción de ~3 ciclos logarítmicos en la población de bacterias totales y psicrótroficas en muestras de leche tratada por UHPH (300 MPa, $T_i=30$ °C) en comparación a las tecnologías convencionales de pasteurización y homogenización. En otros estudios, también se lograron inactivar *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella spp* en muestras de leche tratada por UHPH.

La aplicación del tratamiento UHPH ha demostrado tener la misma eficacia del tratamiento de pasteurización para garantizar la estabilidad microbiológica de la leche. Sin embargo, la UHPH es menos efectiva en la inactivación de las esporas bacterianas, incluso a presiones máximas posibles, lo que limita su aplicación para obtener alimentos de calidad estéril si no es acompañada con una $T_i >60$ °C (Trujillo et al., 2016).

Ventajas y desventajas de las ultra altas presiones por homogeneización

En general, los beneficios de la UHPH incluyen la prolongación de la vida útil a través de la inactivación de microorganismos y mejoras en la funcionalidad de las matrices alimentarias, debido al aumento de la capacidad y estabilidad de la emulsión, sin afectar el valor nutricional y las características sensoriales. Entre otras ventajas importantes de esta tecnología están, además de la reducción del tamaño del glóbulo de grasa, la desfloculación de agregados de glóbulos de grasa y la dispersión uniforme de aglomerados, cambios en la conformación de la proteína, aumento de la viscosidad y estabilidad de la emulsión e inactivación de enzimas. (Mayta et al., 2020)

La UHPH tiene un gran potencial como tecnología emergente para reemplazar a la homogeneización convencional y los tratamientos térmicos, proporcionando estabilidad física y microbiológica de los alimentos líquidos. El tratamiento UHPH a la leche de fabricación quesera ha mostrado resultados prometedores, tales como, alta estabilidad física debido a una mayor reducción del tamaño de partícula, disminución de la carga bacteriana (incluida la reducción de microorganismos patógenos), inactivación de enzimas y cambios en la estructura de las proteínas (agregación de micelas de caseína). Los cambios obtenidos en la microestructura y las características de textura de los quesos apuntan al potencial de la tecnología UHPH para el desarrollo de una nueva generación de quesos. (Mayta et al., 2020)

2.2.7 Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF).

La tecnología por PEF consiste en la aplicación de pulsos eléctricos cortos (1-300 μ s) de alto voltaje (10- 80kV/cm) a un alimento puesto entre dos electrodos, con una capacitancia de 80 nF a 9.6 mF ajustándose en cuenta diversos factores del alimento y de la microbiota contaminante, destruyendo la pared celular de los microorganismos, alterando el potencial interno de la membrana (Silva, 2009; Alcántara, 2013).

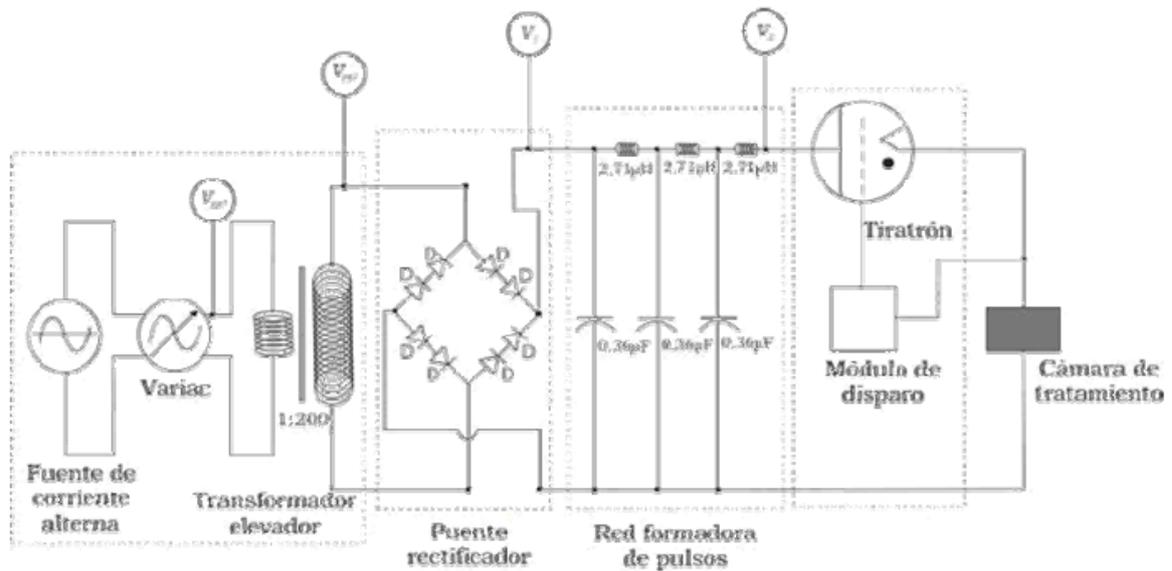
Esta tecnología es considerada superior al tratamiento térmico convencional, debido a que reduce significativamente los cambios que ocurren en las propiedades sensoriales (sabor, color) y físicas (textura, viscosidad) de los alimentos (Barbosa *et al.*, 2001)

Los aspectos más importantes de esta tecnología son la generación de pulsos eléctricos de alta intensidad, el diseño de cámaras para el tratamiento del alimento de tal manera que éste reciba un tratamiento uniforme con un mínimo de incremento de la temperatura y el buen diseño de electrodos para minimizar la electrolisis. Los diferentes componentes con los que cuenta el equipo de tratamiento por PEF son:

- Generador de alto voltaje.
- Interruptor de alto voltaje.
- Cámaras de tratamiento.
- Transformador.
- Sondas de temperatura, voltaje e intensidad de corriente.
- Osciloscopio.
- Sistema de refrigeración (Silva, 2009).

La energía suministrada por una fuente de alto voltaje se almacena en uno o varios condensadores y se descarga a los alimentos en forma de pulsos, obteniendo así un campo eléctrico. Cuando una señal de activación se genera, un interruptor de alta tensión se cierra y la carga almacenada en el condensador pasa a través de las cámaras de tratamiento que contienen el alimento. Un factor limitante a tener en cuenta en el tratamiento por PEF es el fenómeno de la ruptura dieléctrica. Éste consiste en un cambio brusco de la conductividad eléctrica en el interior de la cámara de tratamiento que produce a su vez un aumento brusco de la intensidad de corriente provocando la interrupción del tratamiento. Este cambio brusco puede ser debido a una excesiva intensidad del tratamiento, valor alto de conductividad eléctrica del producto o a la presencia de burbujas de aire. Durante el fenómeno se observa la formación de una chispa en el interior de la cámara de tratamiento, por lo que el fenómeno se conoce también como “arqueo” o “chispa”. Para evitar esto, las cámaras de tratamiento deben estar diseñadas de tal modo que consigan distribuir uniformemente la intensidad de campo eléctrico y así conseguir una mayor efectividad en el tratamiento, evitando las variaciones de campo que podrían aumentar las probabilidades de ruptura dieléctrica (Silva, 2009).

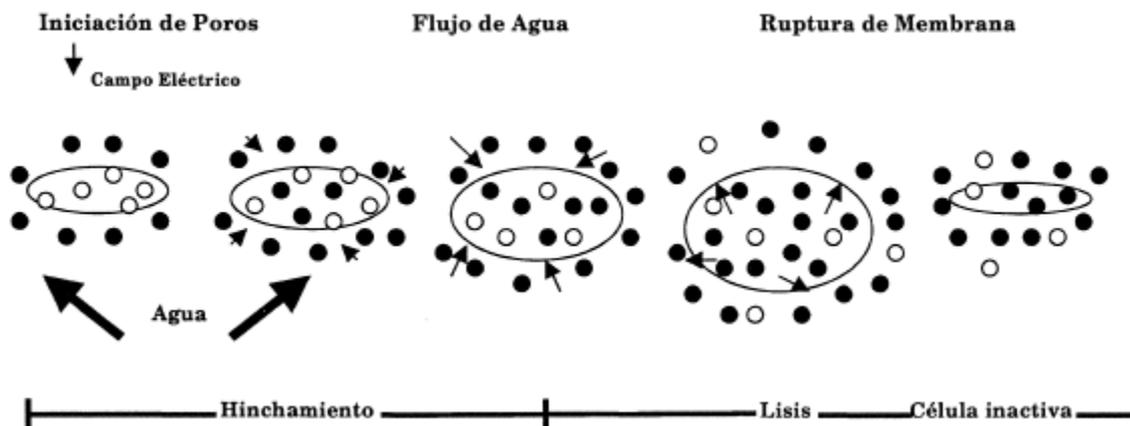
2.2.7-1 Circuito eléctrico para el generador de pulsos de alto voltaje (Ros, 2015)



Mecanismo de acción

Los mecanismos de inactivación de microorganismos incluyen ruptura eléctrica, efecto iónico de pulso y electroporación de las membranas celulares (Fernández *et al.*; 2001). La electroporación es el principal fenómeno involucrado en la inactivación de los microorganismos en el tratamiento por PEF. Ocurre en la membrana celular cuando se aplica una intensidad de campo eléctrico que da lugar a una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana (potencial transmembrana). La membrana, al tener una constante dieléctrica mucho más baja que la mayoría de los alimentos, a la aplicación de los pulsos eléctricos, induce a la acumulación de cargas negativas y positivas dentro de la célula. Este campo eléctrico aplicado desestabiliza temporalmente la capa lipídica y las proteínas de la membrana celular; el plasma de las membranas celulares se hace permeable a pequeñas moléculas y la permeabilidad causa hinchazón y una eventual ruptura de la membrana celular. Cuando esta diferencia de potencial alcanza un valor crítico de 1 voltio, la repulsión entre las cargas lleva a cabo el movimiento de las moléculas, que varía en función del tipo de microorganismo, el diámetro del mismo y sus condiciones de crecimiento. Por ejemplo, para *Escherichia coli* corresponde a un campo eléctrico externo de aproximadamente 10kV/cm para alcanzar el valor crítico de 1 voltio. Al alcanzar este valor, se da la formación de poros en la membrana celular (electroporación) y en consecuencia la pérdida de su integridad por incremento de la permeabilidad y finalmente destrucción de la célula afectada (Silva, 2009). En la Figura 2.2.7-1, se muestra una representación de cómo es que se lleva a cabo el proceso de electroporación.

Figura 2.2.7-2. Electroporación de una membrana celular mostrando las zonas de hinchamiento, lisis e inactivación celular (Fernández *et al.*, 2001).



Aspectos que influyen en la eficiencia en el tratamiento por PEF

- **Intensidad de campo eléctrico**

La intensidad de campo eléctrico se produce en el interior de las cámaras y se define como la diferencia de potencial aplicada a los dos electrodos por la distancia entre ellos (Ecuación 1).

$$E = \frac{V}{d} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde E es la intensidad de campo eléctrico (kV/cm), V diferencia de potencial (Voltios) y d es la distancia entre electrodos (cm). Es uno de los factores más importantes en la inactivación de microorganismos por PEF, ya que para producir la ruptura de la membrana y posterior muerte del microorganismo es necesario superar el denominado potencial crítico transmembrana o intensidad de campo eléctrico crítica (E_c) que suele situarse en un valor de 5 kV/cm (Silva, 2009).

Forma del pulso eléctrico

La forma del pulso interviene directamente en la inactivación de microorganismos. Existen diversos tipos de onda que forman el pulso, los 2 más comunes son:

- Onda de caída exponencial: Este tipo de onda presenta un pico con corto tiempo en el máximo voltaje y una larga cola con un bajo campo eléctrico, hasta llegar a su valor inicial (0kV/cm) (Figura 3).
- Onda cuadrada: Este tipo de onda se basa en alcanzar rápidamente el valor de voltaje aplicado, manteniéndose durante cierto periodo de tiempo y descendiendo rápidamente hasta su valor inicial (Figura 4). Dependiendo de la polaridad de los pulsos de onda cuadrada estos pueden tener características monopolares o bipolares. La aplicación de pulso bipolar produce cambios en la orientación de las moléculas cargadas de las células provocando un estrés añadido en la membrana celular, facilitando su ruptura (Silva, 2009).

Figura 2.2.7-3. Onda de caída exponencial (Silva, 2009).

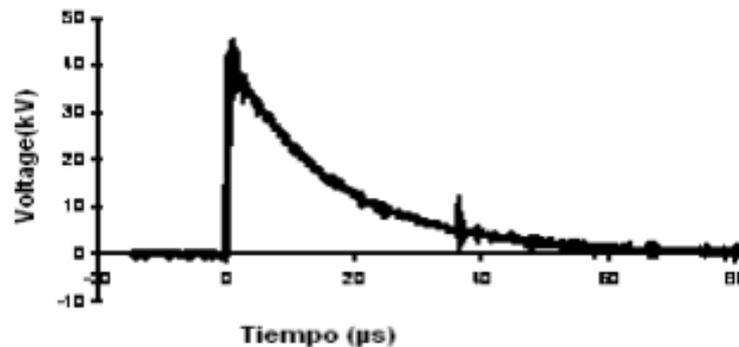
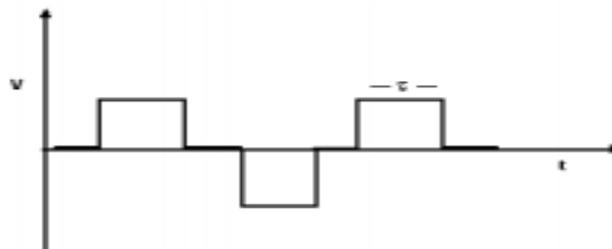


Figura 2.2.7-4. Onda cuadrada bipolar (Silva, 2009).



- **Temperatura**

La temperatura es otro de los factores importantes en el tratamiento por PEF. Durante el tratamiento se produce un aumento de la temperatura que dependerá del campo eléctrico aplicado y del tiempo de tratamiento. Un aumento de la intensidad provocará un mayor aumento de la temperatura. El incremento de la temperatura inicial del tratamiento favorece

la inactivación tanto de enzimas como de microorganismos, produciéndose un efecto sinérgico (pulsos-temperatura) a temperaturas comprendidas entre 35-60°C. Esto es debido a cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana y conductividad eléctrica del alimento, aumentando así las probabilidades de ruptura de la membrana del microorganismo (Silva, 2009).

- **Tiempo de tratamiento.**

En general, un incremento del tiempo de tratamiento produce un incremento de la temperatura y una mayor inactivación, pero varios estudios han demostrado que se consigue una mayor inactivación microbiana aplicando tiempos de tratamiento cortos e intensidades de campo altas (Silva, 2009).

- **Amplitud del pulso eléctrico.**

Si se aplica una amplitud de pulso excesiva y un tiempo largo de tratamiento se puede producir un incremento excesivo de la temperatura y alterar la conductividad del alimento, con la consiguiente reducción en la efectividad del tratamiento. Se ha comprobado que un valor cercano a los dos microsegundos logra una mayor reducción microbiana. Un aumento de la amplitud del pulso no logra en muchos casos un aumento de la inactivación (Silva, 2009).

Factores que afectan el tratamiento por PEF.

Las principales causas que influyen sobre la efectividad del tratamiento por PEF son: La conductividad eléctrica, la fuerza iónica, el pH, la actividad de agua (a_w), presencia de burbujas, antimicrobianos, tamaño de partícula y la composición del alimento. En éste último, se ha observado que La efectividad del tratamiento con PEF se reduce cuanto más compleja es la composición de un alimento (Silva, 2009).

La conductividad eléctrica está relacionada con la transferencia de energía; cuando hay una baja conductividad esto lleva a una mayor eficacia en el tratamiento. Los alimentos que actúan como buenos conductores presentan dificultades para ser tratados con PEF debido a que se genera un pequeño pico del pulso eléctrico en las cámaras de tratamiento; por lo tanto, es conveniente que la conductividad del alimento sea baja para obtener un buen grado de inactivación. Un incremento en la conductividad incrementa la fuerza iónica de los líquidos, disminuyendo la tasa de inactivación. La presencia de iones en el alimento produce efectos variados en los patrones de inactivación. Iones como Na^+ , K^+ actúan sobre la membrana y

alteran las funciones celulares de está, mientras que iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} ejercen un efecto protector al tratamiento con PEF (Silva, 2009).

Las burbujas de aire en el fluido alimentario deben ser eliminadas cuando se usa este método, ya que, como soportan campos eléctricos de alta intensidad, causan arcos eléctricos, que pueden dar lugar a daños en la cámara y en los electrodos. En general, esta tecnología no es recomendable para el tratamiento de alimentos sólidos que retengan burbujas de aire al ser colocados en la cámara de tratamiento. Otra limitación es el tamaño de partícula de los alimentos sólidos. Para mantener una operación de proceso adecuada, el tamaño máximo de partícula en el fluido alimentario debe ser menor que la abertura de la región de tratamiento dentro de la cámara (Barbosa *et al.*, 2001)

Para mantener una operación de proceso adecuada, el tamaño máximo de partícula en el fluido alimentario debe ser menor que la abertura de la región de tratamiento dentro de la cámara (Fernández *et al.*; 2001).

Tipo y cantidad de microorganismos.

La sensibilidad de los microorganismos al tratamiento con PEF varía con cada tipo de microorganismo; las células vegetativas son más sensibles que las esporas. Sin embargo, dependiendo de las condiciones experimentales, se puede lograr una inactivación irreversible de esporas bacterianas. Las grandes células de las levaduras son más fáciles de inactivar que las células bacterianas. Las bacterias Gram positivas son más resistentes al tratamiento con PEF que las Gram negativas, y las células que se encuentran en fase logarítmica son más sensibles que las que están en la fase estacionaria. En la fase logarítmica las células son más sensibles a un factor externo como los pulsos eléctricos, que en la fase estacionaria; ya que las células se encuentran en división y por tanto la membrana celular es más susceptible a los cambios externos. De igual manera, la eficiencia del tratamiento se ve afectada por la concentración inicial de microorganismos en el alimento a tratar. Cuando el tamaño del inóculo es grande se reduce el efecto letal del tratamiento (Silva, 2009). En la Tabla 2.2.7-1, se muestran algunos microorganismos que han sido tratados por PEF bajo diferentes condiciones.

Tabla 2.2.7-1. Inactivaciones microbiológicas mediante el uso de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad tomado y adaptado de Fernández *et al.*, 2001.

Microorganismos e inoculación inicial	Medio de suspensión	Reducción logarítmica (UFC/ml)	Temperatura °C	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo (μseg)	Número de pulsos
<i>E. coli</i> (10 ⁹ ufc/ml)	leche descremada	1-3	15	20-45	0.7-1.8	64
<i>E. coli</i> (10 ⁹ ufc/ml)	Leche modificada	9	20	70	160	80
<i>E. coli</i> (10 ⁷ ufc/ml)	Leche entera	3	-----	22	200	5
<i>B. subtilis</i> 3x10 ³ esporas/ ml	Leche modificada	5	60	60	-----	75
<i>S. aureus</i>		2	37	16	200-300	60
<i>E. coli</i>		3-4	37	16	200-300	60
<i>B. subtilis</i> y <i>L. delbrueckii</i>		4-5	30	16	200-300	40-50
<i>E. coli</i> (10 ⁷ ufc/ml)		2.2	10	40-50	-----	8
<i>Salmonella dublin</i> (10 ⁵ UFC/ml)	Leche descremada	3	10-50	15-40	12-127	-----

Ventajas y desventajas de los pulsos eléctricos de alto voltaje

Esta tecnología es considerada superior al tratamiento calórico convencional debido a que reduce los cambios que ocurren en las propiedades organolépticas de los alimentos. Además de conservar los atributos sensoriales de los alimentos, los PEF no introducen cambios químicos significativos en los alimentos. Se ha demostrado la eficacia de éste método en la preservación y extensión de la vida de productos como la leche, huevos líquidos, jugos de manzana, naranja y yogurt entre otros. Este método se ha usado como un tratamiento alternativo a la pasteurización siendo su uso limitado a productos fluidos, capaces de conducir la electricidad y exentos de microorganismos esporulados (Silva, 2009). Se ha visto que leche cruda tratada con pulsos eléctricos, aumenta su vida útil en refrigeración hasta 5 días y hasta dos semanas para leche cruda descremada (Chandan *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2001).

Dentro de las desventajas que se pueden encontrar en éste método son

- Alto costo del equipo
- Pequeña capacidad de la cámara de tratamiento
- Erosión de electrodos
- Alto consumo de energía

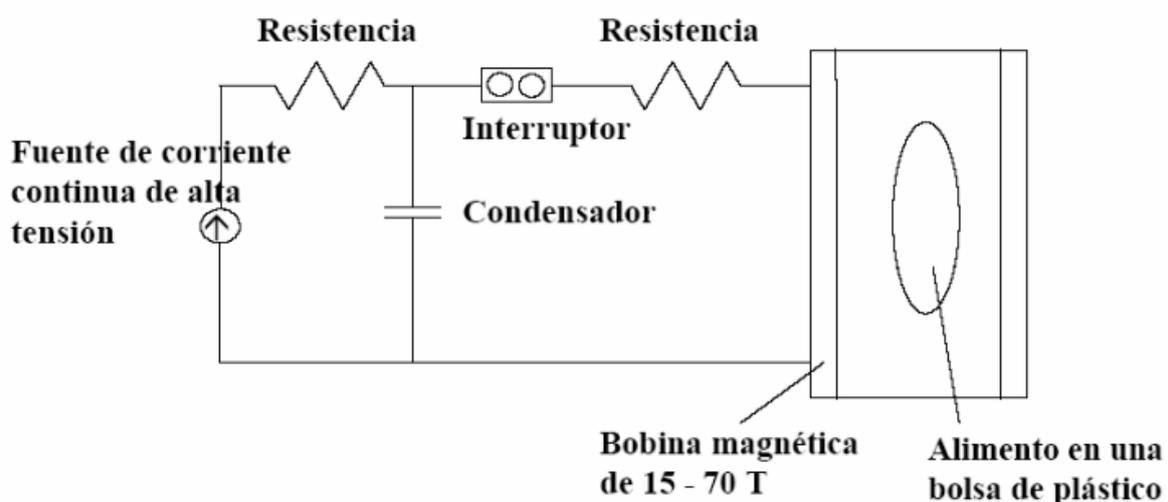
- Cambios sensoriales indeseables (Raso et al., 2015)

2.2.8 Campos magnéticos oscilantes

Los campos magnéticos oscilantes (CMO), producen estimulación o inhibición en el crecimiento y reproducción de los microorganismos, un simple pulso de intensidad de 5-10 teslas y frecuencias de 5-500 kHz es suficiente para reducir el número de microorganismos en un mínimo de 2 ciclos logarítmicos con tratamientos que se llevan a cabo a presión atmosférica y a una temperatura que estabiliza el material alimenticio. (Fernández *et al.*, 2001).

Los CMO son generados mediante electro magnetos de corriente alterna, y su intensidad varía de manera periódica dependiendo de la frecuencia y del tipo de onda del magneto. Estos campos, generados por pulsos, son de naturaleza electromagnética asociados con un componente de campo eléctrico capaz de inducir corrientes eléctricas en sistemas biológicos estacionarios. La inactivación de microorganismos requiere el uso de OMF de alta intensidad, 5-50 Teslas (1 Tesla= 10.000 Gauss). Dichos campos pueden ser generados mediante el uso de bobinas superconductoras, bobinas que producen campos de corriente directa, y bobinas energizadas por la descarga de energía almacenada en un capacitor (García, 2014)

Figura 2.2.8-1. Esquema de funcionamiento básico de un sistema de CMO (Ros, 2015)



La fuerza del campo magnético (H) se mide en Oerstedts, unidad definida como una línea de fuerza por cm²; mientras que la densidad de flujo magnético (B) se mide en Teslas (o Gauss). En el vacío, y para propósitos prácticos en el aire, la fuerza del campo magnético es aproximada por la densidad de flujo magnético; de manera que la fuerza del campo magnético es comúnmente especificada en unidades de Teslas o Gauss. Con respecto a su fuerza relativa, los campos magnéticos débiles tienen intensidades del orden de decenas de Gauss, semejantes a aquéllos producidos por aparatos electrodomésticos. Los OMF de alta intensidad se encuentran en miles de Gauss y mayores. (García, 2014)

Mientras tanto los campos magnéticos oscilantes requieren envasar el alimento en un material plástico, el producto es sometido a un campo magnético de una intensidad de entre 5-50 teslas y una frecuencia que puede variar entre 5-500 kHz durante 25 s a 10 ms de 0-50°C causando la ruptura de la molécula de ADN y disgregación de proteínas. Sólo alimentos como jugos, frutos tropicales en soluciones azucaradas, derivados cárnicos, envasados y listos para el consumo son procesados por éste método (Alcántara, 2013; Fernández *et al.*, 2001).

Según Pérez (2011), para que un alimento se pueda conservar usando CMO, debe poseer una resistividad eléctrica alta (> 25 ohmios/cm). La intensidad del campo magnético a utilizar dependió de la resistividad y el espesor del alimento o muestra de productos alimenticios a tratar. Aquellos que presentan baja resistividad y mayores espesores requieren campos magnéticos más potentes.

Mecanismo de acción

La inactivación de microorganismos está basada en la teoría de los campos magnéticos oscilantes, los cuales pueden acumular la energía en partes activamente magnetizadas de grandes moléculas como las de ADN. Dentro de un intervalo de 5 a 50 T. Un campo magnético oscilante débil puede debilitar los enlaces entre iones y proteínas, provocando su ruptura. Los CMO actúan alterando la velocidad de división celular de los microorganismos por efecto del cambio del flujo iónico a través de la membrana plasmática (Soleno, 2015). En presencia de un campo magnético inmóvil, como el de la tierra, los efectos biológicos de los campos magnéticos oscilantes son más pronunciados alrededor de frecuencias particulares, tales como la frecuencia de resonancia del ciclotrón de iones. A una resonancia de ciclotrón, la energía es transferida selectivamente del campo magnético al ion con una girofrecuencia equivalente a la frecuencia del campo magnético. El sitio de interacción del campo magnético es el tejido de la bacteria. Los iones transmiten los efectos de los campos magnéticos a otros tejidos de órganos a través del sitio de interacción. La transferencia de energía a los iones

resulta en un incremento en la velocidad y acumulación iónica y por lo tanto en un incremento en la red de transporte de iones tales como Ca^{2+} a través de la membrana. Un incremento en el flujo de iones Ca^{2+} es frecuencia específica, mientras que los cambios inducidos en las actividades metabólicas ocurren en un rango de frecuencias. (García, 2014; Fernández *et al.*, 2001)

Con diferentes oscilaciones y ensamblajes de dipolos se obtiene suficiente activación local que puede resultar en la ruptura de los enlaces covalentes de la molécula de ADN y por consiguiente en la inactivación de los microorganismos. Una segunda teoría considera el efecto de los campos magnéticos oscilantes en enlaces de iones de calcio pegados a proteínas tales como la calmodulina. Los iones de calcio continuamente vibran alrededor de una posición de equilibrio en el sitio de enlace de la proteína. Aplicando un campo magnético inmóvil, se da la rotación y vibración del campo magnético a una frecuencia que es exactamente la frecuencia del ciclotrón del enlace del calcio. Al agregar un campo magnético vibratorio a la frecuencia del ciclotrón se perturba la precisión a tal extensión que resulta en la debilitación del enlace entre el ion de calcio y la proteína (Fernández *et al.*, 2001).

Factores que afectan a los campos magnéticos oscilantes

La conservación de alimentos con campos magnéticos oscilantes, involucra someter los alimentos con 1-100 pulsos con una frecuencia de 50 a 500 kHz y temperatura de 0 a 50°C para un tiempo total de exposición que varía entre 25 y 100 ms, sin cambios apreciables en su calidad y la temperatura del alimento aumenta entre 2 y 5 °C. Para el caso de leche se ha visto que un pulso es suficiente para reducir la población bacteriana entre 10^2 y 10^3 microorganismos/ml. La intensidad del campo magnético, requerida para obtener estos efectos, varía entre 2-25 T y las frecuencias entre 5-500 kHz dependiendo de la carga microbiana y la cantidad de partículas en la leche (Fernández *et al.*, 2001).

Tabla 2.2.8-1 Efecto de los CMO en diferentes productos (Tomado y adaptado CTIC-CITA, 2011)

Microorganismo	Medio de inactivación	Intensidad de campo (T)	Número de pulsos	Frecuencia (KHz)	Reducción de población	T°	Recuento inicial de bacterias/ml	Recuento final de bacterias/ml
<i>Streptococcus termophilus</i>	Leche	12	1	6	2	23	25,000	970
<i>Saccharomyces</i>	Zumo naranja	40	1	416	4	4	3,500	25
<i>Saccharomyces</i>	Yoghurth	4	10	416	3	20	25,00	6

Ventajas y desventajas de los campos magnéticos oscilantes.

Si bien es apreciable un aumento de la temperatura en los productos tratados (2-5°C), el impacto sobre las propiedades organolépticas suele ser poco perceptible, además se consideró un método seguro teniendo como ventajas aspectos como:

- Mejora la calidad y aumenta la vida útil de los alimentos pasteurizados
- No requiere preparación especial del alimento
- Desnaturalización térmica mínima
- Exigencias reducidas de energía
- Tratamiento potencial del alimento en un envase flexible para prevenir una contaminación posterior (Ros, 2015; Soleno, 2015)

Sin embargo, El uso de los CMO aún tiene algunas necesidades de investigación como son:

- Identificar los patógenos resistentes
- Determinar los factores críticos del proceso
- Validar el proceso
- Identificar microorganismos de referencia (García, 2014)

2.2.9 Plasma no térmico.

El plasma es un estado de la materia que comparte propiedades similares a las de los gases y los líquidos. Contiene gas parcial o totalmente ionizado con una mezcla de tres componentes: electrones libres, iones positivos y moléculas neutras (Wan *et al.*, 2009)

El plasma es un gas ionizado que se genera por la aplicación de un campo eléctrico o electromagnético a un gas (aire, oxígeno, nitrógeno, argón, helio) donde los electrones colisionan con las moléculas o átomos del gas produciendo su ionización. Además, los electrones producen disociación molecular dando lugar a átomos y radicales libres. Por tanto, el plasma está compuesto por moléculas y átomos en estado o no de excitación, iones positivos y negativos, radicales libres, electrones, radiación UV, etc. Además, cuando el gas es oxígeno y nitrógeno, también se forman especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como ozono, superóxido, radicales hidroxilo, oxígeno singlete, oxígeno atómico, óxido nítrico, dióxido de nitrógeno, etc. Todas estas especies presentan capacidad para inactivar una amplia gama de microorganismos como bacterias, mohos, levaduras, esporas y algunos virus. El potencial del plasma frío para inactivar microorganismos dependerá de las condiciones de tratamiento y del tipo de gas utilizado para generar el plasma. Se puede concluir que el grado de inactivación microbiana aumenta con la energía aportada, el contenido en humedad y la velocidad de flujo del gas empleado, así como con la presencia

de oxígeno en el gas o mezcla de gases usados, siendo capaces de excitar átomos y moléculas a niveles superiores de energía que, al retornar al estado más estable, emiten el exceso de energía en forma de radiaciones electromagnéticas de amplio espectro, incluyendo radiaciones en el rango ultravioleta. (Sanchez, 2018; Soleno, 2015)

Un gas neutro se puede convertir en plasma mediante la aplicación de energía en varias formas, entre ellas; campos térmicos, eléctricos o magnéticos y frecuencias de radio o microondas, lo que resulta en un aumento de la energía cinética de los electrones de los átomos de gas constituyentes. Esto causa una cascada de colisiones en el gas que resulta en la formación de productos de plasma de electrones, iones, radicales y radiación de diferentes longitudes de onda incluidas en los rangos UV. También se puede generar un plasma a baja temperatura a bajas presiones, mientras se mantiene el equilibrio energético, ya que hay menos partículas de gas presentes, lo que provoca menos colisiones y produce electrones de alta energía y partículas más pesadas con baja energía y temperatura (Wan *et al.*, 2009).

Mecanismo de acción

El plasma puede inactivar las formas vegetativas y las esporas bacterianas. Tres mecanismos básicos han sido atribuidos a la inactivación de los microorganismos por plasma no térmico. Estos incluyen la destrucción del ADN por irradiación UV, la volatilización de los compuestos de la superficie de las esporas por los fotones UV y la erosión, también llamado "grabado" de la superficie de las esporas por adsorción de especies reactivas como los radicales libres. La efectividad del plasma para inactivar los microorganismos dependerá en gran medida del diseño del equipo y las condiciones operativas, como el tipo de gas, el caudal y la presión. El grado de inactivación microbiana conseguido aumenta con la energía aportada, el contenido en humedad y la velocidad de flujo del gas empleado, así como con la presencia de oxígeno en el gas o mezcla de gases usados (Wan *et al.*, 2009; Soleno, 2015)

Esta tecnología permite tiempos de tratamiento cortos, siendo posible conseguir más de 5 reducciones logarítmicas en el número de microorganismos patógenos viables (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, entre otros), e incluso, microorganismos esporulados, como *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, en tiempos realmente cortos, entre 30 segundos y 2 minutos. (Soleno, 2015)

Tabla 2.2.9-1. Reducción de patógenos de interés alimentario tratados con plasma frío (Saavedra, 2019)

Patógeno	Concentración inicial (UFC/ml)	Distancia de aplicación (cm)	Reducción (UFC/ml)
<i>Bacillus cereus</i>	7.47	9	7.13
<i>Listeria innocua</i>	9.38	7	9.02
<i>Listeria ivanovii</i>	9.16	9	8.73
<i>Listeria monocytogenes</i>	10.43	9	9.19
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.97	9	8.52
<i>Escherichia coli</i>	9.56	5	8.88
<i>Salmonella enteritidis</i>	9.38	5	8.6
<i>Salmonella typhimurium</i>	8.7	5	8.33
<i>Shigella flexneri</i>	9.22	5	8.75
<i>Shigella sonnei</i>	9.53	5	8.55

Ventajas y desventajas del uso de plasma frío

Dentro de las ventajas del plasma frío son que es práctico, rápido, no deja residuos químicos objetables ya que en ningún caso se emplean sustancias químicas extrañas, por lo que no hay compuestos tóxicos, ni cancerígenos, ni se crean condiciones de toxicidad para las personas ni animales. Se puede aplicar inclusive en envases cerrados. Sin embargo, algunas de las desventajas que genera el uso del plasma frío en leche, es que puede acelerar el proceso de rancidez de la misma, debido a la formación de los mismos radicales libres y formas reactivas de oxígeno en su uso para leche fluida. (De Piante *et al.*, 2016)

2.2.10 Centrifugación (Bactofugación).

Esta centrifugación a menudo se denomina bactofugación porque el equipo comercial fabricado por Tetra Pak® se comercializa bajo la marca registrada de Bactofuge®. Uno de los propósitos que tiene la centrifugación es el de limpiar la leche, principalmente de remover las partículas de suciedad, leucocitos, bacterias y sus esporas. (Walstra *et al.*, 1999)

La separación por centrifugación se basa en las diferencias de densidad entre las partículas y la fase de dispersión (plasma). La centrifugación se aplica generalmente a los glóbulos de

grasa separados. La clarificación con una centrifugadora rara vez se usa en la industria láctea, excepto para la eliminación de las esporas bacterianas de la leche que está mínimamente pasteurizada. A pesar del tamaño bastante pequeño de las esporas (1 a 1,5 μm), la aclaración de la leche es posible, debido a la diferencia de densidad entre la leche ($1.028 \pm 1.038 \text{ g/ml}$) y las esporas bacterianas ($1.30 \pm 1.32 \text{ g/mL}$). Por otro lado, las formas vegetativas de las bacterias, normalmente tienen una densidad mucho menor ($1.07 \pm 1.12 \text{ g/ml}$) y son más difíciles de eliminar (Gésan, 2010).

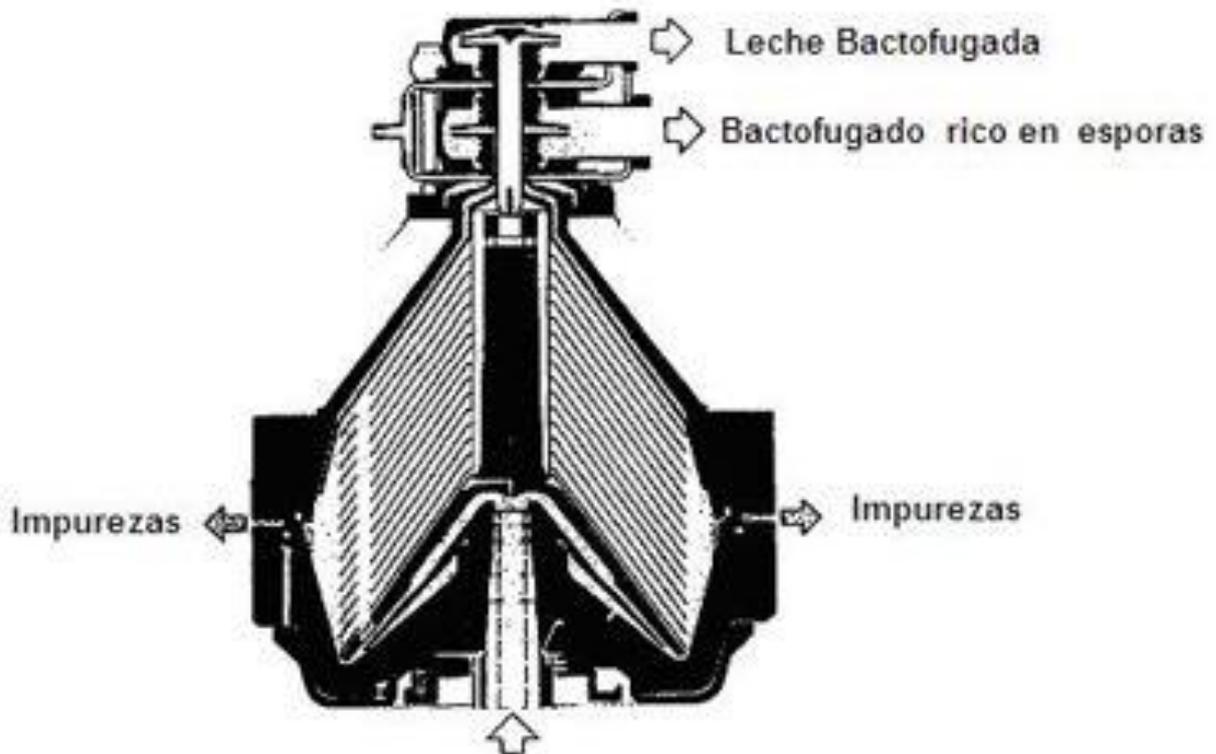
Mecanismo de acción

La fuerza centrífuga impulsa las bacterias y/o esporas en cada rendija hacia la periferia del recipiente y la leche reducida en bacterias se mueve hacia el eje central de la centrífuga. Ambas corrientes se mueven hacia arriba y permanecen separadas, antes de descargarse de la centrífuga (Gésan, 2010). En equipos modernos, el rango de centrifugación se encuentra en las 16,000 rpm para obtener una reducción significativa en la carga bacteriana inicial. En la Figura 2.2.10-1 se muestra el esquema de una centrifugadora de una fase.

Varios factores influyen en la eficiencia de la bacto-fugación. Algunos están relacionados con las características de los microorganismos como son:

- Tamaño ($0.5 \pm 7.0 \mu\text{m}$), forma (esférica o en forma de barra) y características de la superficie exterior (rugosa o lisa) de los microorganismos.
- Densidad de los microorganismos.
- Capacidad de aglomerarse entre las bacterias mismas o entre los componentes de la leche.
- Calidad bacteriológica de la leche, que puede llevar a cambios químicos o físicos.
- Temperatura de bacto-fugación ($50 \text{ a } 68 \text{ }^\circ\text{C}$), que desempeña un papel importante en la viscosidad.
- Capacidad de la máquina, por ejemplo, la tasa de flujo de leche.
- Fuerza centrífuga (número de revoluciones por minuto).
- Diseño de la centrífuga, que debe evitar la recontaminación de la leche centrifugada (Gésan, 2010).

Tabla 2.2.10-1. esquema de una centrifugadora de una fase. Tomado de Osorio,2015



Con respecto a la eficiencia de la aclaración de los sólidos no lácteos, la temperatura tiene poca influencia y el proceso se puede realizar a una temperatura fría o cálida (3 a 12 °C o 52° a 58 ° C). Sin embargo, si se van a eliminar las bacterias y las esporas, solo es eficaz la clarificación con leche a 73°C, para obtener una reducción de 3 decimal. La temperatura de bactofugación de la leche es similar a la utilizada en el separador de crema, y el bactofugador normalmente se instala en serie con el separador centrífugo, ya que esta última máquina se utiliza para estandarizar el contenido de grasa en la leche para queso (Gésan, 2010, Walstra *et al.*, 1999). Una máquina de este tipo trabajando a su capacidad nominal puede eliminar un 98 % de las esporas anaerobias, 95% de las esporas aerobias y reduce el recuento total alrededor de un 86 %. Todo este proceso tiene lugar sin separación de fases en un sistema cerrado, en ausencia de aire. (Fernandez, 2012)

Ribeiro *et al.*, 2020, observaron que la leche cruda precalentada a 55 °C, inmediatamente antes de la bactofugación (10 000 × g) fue suficiente para reducir el aislamiento del 88% de mesófilos en leche precalentada. Para psicrófilos, fue posible verificar una reducción del 72,5% en el lote y en los termófilos no se recuperaron en los límites de detección más altos (<5 ufc/mL).

Ribeiro *et al.*, 2020 identificaron 15 especies de bacterias termodúricas contaminantes en leche cruda de las cuales solo 6 especies se recuperaron en leche bacto-fugada. Por otro lado, solo se encontraron en la leche bacto-fugada, las especies *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus licheniformis*. Se sabe que ambas especies son psicrótrofas formadoras de endosporas y tienen actividad proteolítica o lipolítica. La bacto-fugación de leche cruda redujo el número de aislamientos de *B. licheniformis*, *Bacillus toyonensis*, *Micrococcus aloeverae* y *Aestuariimicrobium kwangyangense* en un 33, 43, 86 y 92%, respectivamente, y redujo los aislamientos de *Macrococcus caseolyticus*, *Lysinibacillus varians*, *Carnobacterium divergens*, *Microbacterium hominis*, *Kocuria indica*, *Micrococcus yunnanensis*, *Gordonia paraffinivorans*, *Bacillus invictae* y *Kocuria kristinae* hasta niveles indetectables. Los resultados de este estudio indican que la industria láctea puede aplicar la bacto-fugación para reducir los microorganismos resistentes a la pasteurización en combinación con medidas profilácticas para evitar la contaminación de la leche cruda por esporas y formas vegetativas de bacterias.

Ventajas y desventajas de la bacto-fugación

La bacto-fugación se puede emplear como complemento a tratamientos térmicos de termización, pasteurización y esterilización en la industria láctea ya que, aunque no elimina la totalidad de microorganismos, es bastante eficaz eliminando esporas resistentes a los tratamientos térmicos; realizándose antes de éstos como pretratamiento se consigue aumentar su eficacia. (Ortiz, 2015)

La doble bacto-fugación de la leche previa a la producción de queso con centrífugas modernas puede conseguir reducciones de más del 99% del número de esporas presentes originariamente. Esta reducción sería suficiente para producir queso sin ningún riesgo. La doble bacto-fugación requiere mayor inversión que una bacto-fugación simple. (Fernandez, 2012)

2.2.11 Microfiltración.

La microfiltración consiste en el paso de producto a presión relativamente baja (aproximadamente 1 bar) a través de una membrana semipermeable con tamaños de poros que van desde 0,2 a 5µm. La microfiltración de flujo cruzado es un proceso a temperatura más baja para la producción de productos lácteos con una vida en condiciones de almacenamiento prolongada. (Fernandez, 2012) Este método está especialmente adaptado

a la eliminación de bacterias de la leche desnatada, ya que el tamaño de los microorganismos está en el mismo rango que los glóbulos grasos (Gésan, 2010).

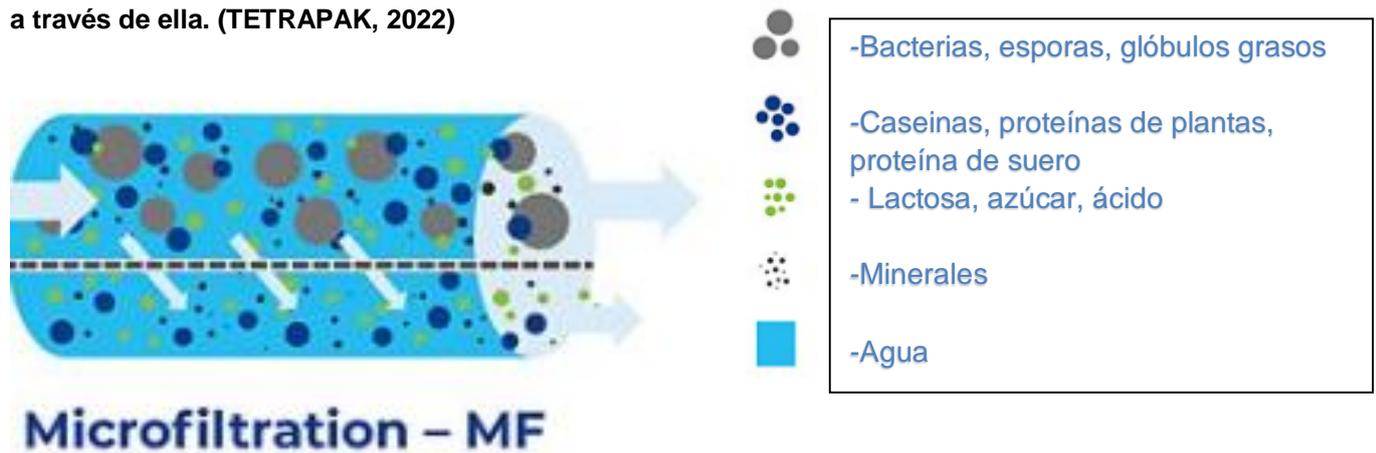
Una membrana es una barrera selectiva que permite el transporte de unos componentes e impide el de otros. Éstas contienen poros por los que pasan las especies en función del tamaño molecular de las mismas. La microfiltración puede reducir la cantidad de bacterias y esporas sin afectar al sabor de la leche y proporciona una vida útil mayor que la pasteurización, puesto que puede llevarse a cabo a bajas temperaturas o a temperatura ambiente. (Fernandez, 2012)

Las aplicaciones de la microfiltración en la industria láctea se realizan más comúnmente con membranas inorgánicas (principalmente membranas cerámicas). Se fabrican mediante la combinación de metales tales como aluminio, titanio o zirconio, con un no metal en forma de un óxido, nitruro o carburo que proporcionan una fuerte resistencia mecánica que permite el uso de velocidades de recirculación altos del retenido. También permiten la microfiltración de fluidos viscosos, una amplia tolerancia de pH (1 hasta 14). Las características más importantes de las membranas son: grosor, diámetro de poro, permeabilidad al disolvente y porosidad. Otros parámetros importantes son: densidad de flujo de permeado, resistencia térmica, química y mecánica. (Fernandez, 2012)

Los procesos de membrana se aplican para separar un líquido en dos fracciones de composición diferente. El líquido está encerrado en un sistema confinado por una membrana semipermeable. Los componentes que pasan la membrana semipermeable constituyen el permeado. La fracción retenida se llama retenido (o concentrado). En la industria láctea, los procesos de filtración por membrana operan en modo de flujo cruzado. Este modo de operación hace posible barrer los solutos rechazados de la membrana e influye en el transporte hacia atrás de los solutos acumulados hacia la mayor parte de la alimentación (Gésan, 2010).

Independientemente de su material, la membrana se compone de dos partes: una capa de soporte macroporosa gruesa que garantiza la resistencia mecánica de la membrana y una capa activa delgada unida al soporte que garantiza la selectividad. (Lara, 2015)

Figura 2.2.11-1. Ejemplo de membrana en el cual se muestran las partículas que pueden pasar a través de ella. (TETRPAK, 2022)



Mecanismo de acción

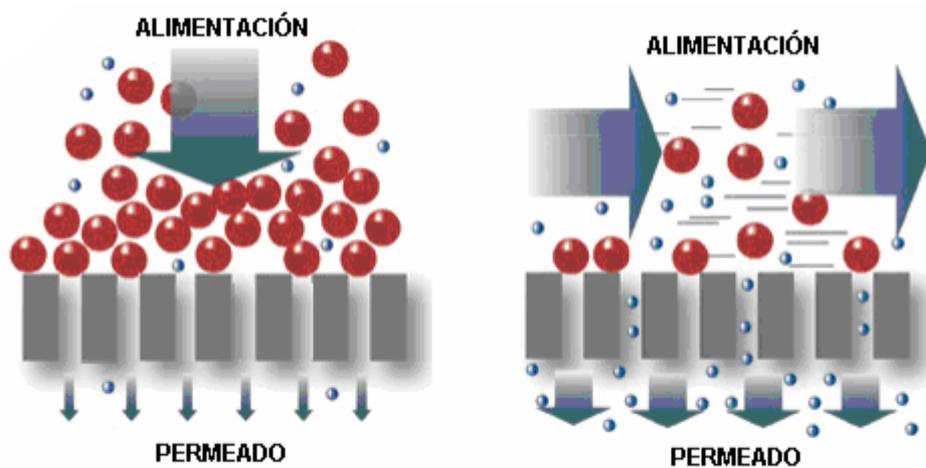
La función primordial de la membrana es actuar como barrera selectiva, permitiendo el paso de determinados componentes y la retención de otros de una determinada alimentación. Su selectividad está relacionada con las dimensiones de la molécula o la partícula de interés. (Fernandez, 2012) Algunos de los parámetros más importantes que influyen en las operaciones con membranas son la composición química, temperatura, presión, flujo de alimentación e interacciones entre los componentes en la corriente de alimentación y la superficie de la membrana. (Fernandez, 2012)

Según la dirección del flujo respecto a la membrana, se pueden distinguir la filtración convencional o frontal, donde el flujo de fluido es perpendicular a la superficie de la membrana, de forma que los solutos se depositan en ella, requiriendo la interrupción periódica de la operación para limpiar o sustituir el filtro. En la filtración tangencial, la alimentación circula paralela a la superficie de la membrana y el soluto que tiende a acumularse en la superficie de la membrana es arrastrado debido a las elevadas velocidades, haciendo el proceso más eficiente. (Tetrapak, 2022)

Si el flujo de permeado excede un valor crítico hay una deposición irreversible de sólidos en la superficie de la membrana, que no puede ser arrastrados durante los primeros instantes de la filtración. Cerca de la superficie de la membrana la velocidad tangencial es considerablemente menor lento que en el centro del canal de flujo. En el centro del canal el flujo es turbulento pero se reduce a laminar en las cercanías de la superficie de la membrana. El espesor de esta capa con flujo laminar es importante porque contiene partículas más pequeñas que en el resto de los casos. En la microfiltración de leche, las micelas de caseína

son retenidas en este flujo laminar si la capa es mayor que las propias micelas. (Fernandez, 2012)

Figura 2.2.11-2. Filtración tangencial y frontal en membrana (TETRAPAK, 2022)



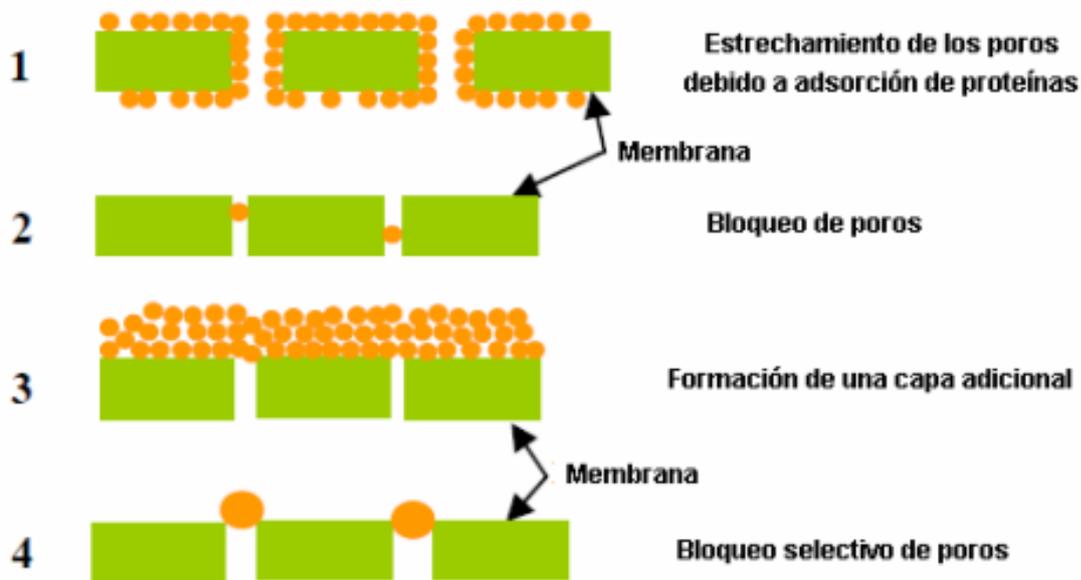
Filtración tangencial y filtración frontal (www.tetrapak.com)

El estrechamiento de poros es el resultado de la adsorción de partículas a la superficie de la membrana debido a las propiedades electroestáticas del soluto y la membrana. El bloqueo de poros es posible aunque el tamaño de poro sea superior al de las partículas, debido a la formación de agregados en la superficie o en el interior de la estructura de la membrana. El ensuciamiento interno de la membrana reduce el flujo de permeado y la selectividad si la membrana tiene una estructura compleja. La selectividad de la membrana es mejor para valores inferiores al flujo crítico pero aumenta la necesidad de área de membrana. El flujo crítico depende del esfuerzo cortante, de la temperatura, las características de las partículas en el líquido y las características de la membrana como la morfología y el material del que está compuesta. (Fernandez, 2012)

Las posibles ventajas de separación con membranas son una reducción en el consumo de energía y un menor daño por cizallamiento en los componentes sensibles, como las membranas de los glóbulos grasos, resultando en una mayor estabilidad de la nata y una mejora sensorial en las propiedades de los productos de consumo. El diámetro de los glóbulos de grasa en la leche cruda se encuentra entre 0.1 y 15 μm , con un promedio de alrededor de 3.4 μm . Para evitar la aglutinación de los glóbulos de grasa durante la separación, por lo general, la microfiltración se lleva a cabo alrededor de 50°C. Además, las células somáticas

son totalmente retenidas por la membrana y por consiguiente, la leche microfiltrada no será degradada por sus enzimas termodúricas. (Fernandez, 2012)

Figura 2.2.11-3. Mecanismos que causan el estrechamiento y bloqueo de poros de la membrana (Fernandez, 2012)

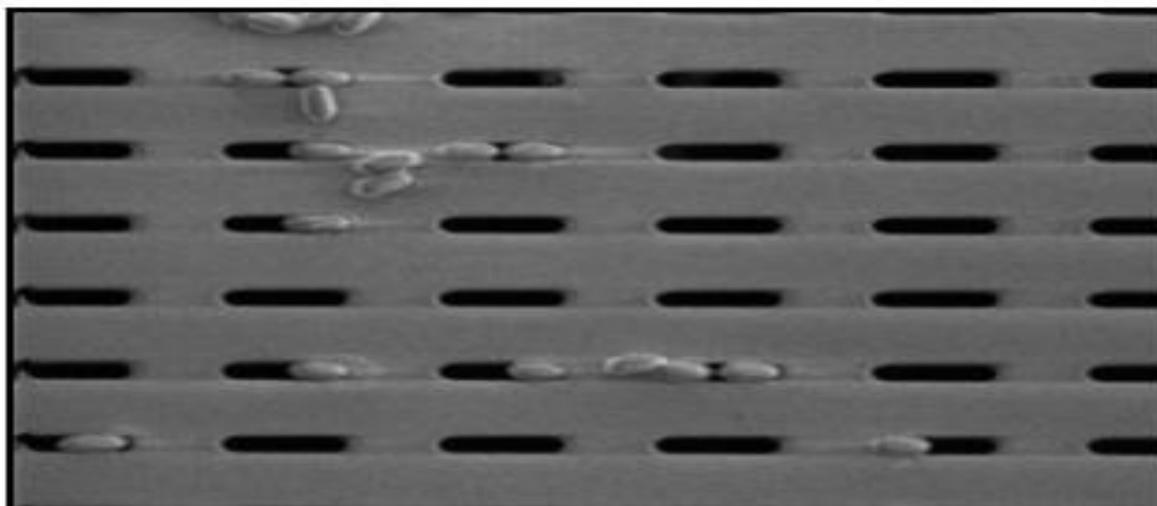


Un desarrollo reciente es el microtamizado "microsieve". La silicona es el material que se utiliza como base en la fabricación de estas membranas. Proporciona la posibilidad de crear estructuras tridimensionales y una elevada resistencia mecánica comparable a la del acero consiguiendo una estrecha distribución del tamaño de poro. Los poros de la membrana se consiguen con equipos de litografía láser de interferencia. Se parte de una oblea redonda estándar de 150 mm de diámetro de silicona. La oblea se cubre con una capa de nitruro de silicio de 1 μm de grosor. Esta capa se expone a luz UV utilizando una plantilla con la distribución de poro deseado. La capa de nitruro es inerte a los agentes químicos por lo que se realiza un grabado con plasma para transferir los pequeños poros a la capa de nitruro de silicio. A continuación, se elimina el nitruro de silicio expuesto al grabado con plasma. Este tipo de membranas tienen una elevada permeabilidad, que ha probado ser más de 200 veces mayor que las membranas poliméricas o cerámicas tradicionales. Su resistencia hidrodinámica es muy reducida, permitiendo presiones a través de la membrana extremadamente bajas, lo que reduce significativamente la tendencia al ensuciamiento y reduce los costes de operación.

Ventajas y desventajas de la microfiltración.

La elevada porosidad de la membrana y la pequeña longitud del canal del poro, 1 μm , son los factores que contribuyen a la elevada permeabilidad. En la Figura 2.2.10-4 se puede observar una fotografía de una membrana de este tipo (Fernandez, 2012)

FIGURA 2.2.11-4: Fotografía de un microtamiz (Fernandez, 2012)



Otro desarrollo reciente es la deposición de capas atómicas (ALD – Atomic Layer Deposition). Se aplica a la modificación estructural y la perforación a medida de membranas cerámicas. Se utilizan membranas cerámicas con un tamaño medio de poro de 50 nm como sustrato, sobre las que se deposita Al_2O_3 mediante ALD con el objetivo de hacer un poro con el tamaño deseado. El espesor de la capa de Al_2O_3 aumenta con el número de ciclos de ALD y, se confirma mediante microscopio electrónico que el tamaño de poro de la membrana cerámica disminuye con el número de ciclos de ALD hasta que los poros están completamente sellados. Se forma una ultradelgada capa selectiva con una estructura con gradiente de porosidad cuyo espesor puede controlarse variando la exposición al precursor. Con un aumento de los ciclos de ALD, la capa depositada de Al_2O_3 tiene un descenso en el flujo al agua y una mayor retención se seroalbúmina bovina. (Fernandez, 2012)

2.2.12 Luz de alta intensidad.

La luz es una radiación electromagnética que se desplaza en forma de longitudes de onda. Esta energía viaja en trayectorias rectilíneas y en todas las direcciones desde su fuente de emisión. Ésta puede ser considerada como una corriente de energía y la cantidad de energía emitida por una corriente de luz es un factor de su frecuencia y longitud de onda (Vásquez, 2015).

Los pulsos de luz son producidos utilizando tecnologías que multiplican la potencia varias veces. La potencia se magnifica por la acumulación de energía eléctrica en un condensador que almacena energía por lapsos de tiempo. Esta energía almacenada se utiliza para realizar el trabajo en tiempos mucho más cortos. El resultado es una potencia elevada durante el ciclo de trabajo, con un gasto moderado en el consumo de energía (Fernández *et al.*, 2001).

Los pulsos de luz de alta intensidad, provenientes del espectro de la luz blanca, inducen reacciones fotoquímicas y fototérmicas en los alimentos, causando la muerte de gran cantidad de microorganismos, especialmente en productos alimenticios envasados. La tecnología de pulsos de luz es un método no térmico de conservación que se basa principalmente en el efecto microbicida de la luz ultravioleta (UV). (Fernández *et al.*, 2001).

Cada pulso de luz dura solamente millonésimas de segundos. Durante cada pulso que pasa la intensidad de la luz es de unas 200.000 veces la intensidad de la luz en la superficie terrestre. Dentro del espectro electromagnético de la luz, la luz ultravioleta causa cambios fotoquímicos mientras que la luz visible e infrarroja causan cambios fototérmicos. (Fernández *et al.*, 2001). El efecto germicida es debido tanto al alto contenido de UV como a los breves efectos de calentamiento que provienen de la parte infrarroja de la luz. Mientras que los rayos UV dañan el ácido nucleico y otros componentes de la célula, el calentamiento instantáneo de la célula da como resultado la ruptura de la pared celular o la lisis. (Adzahan *et al.*, 2007) Los efectos antimicrobianos de estas longitudes de ondas son primariamente mediados a través de la absorción de sistemas conjugados de dobles enlaces carbono-carbono en proteínas y ácidos nucleicos. (Fernández *et al.*, 2001).

Luz ultravioleta.

La radiación ultravioleta se ha utilizado durante varios años como medio de desinfección física para aire, superficies y líquidos. Durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos líquidos, la contaminación puede tener lugar en muchos puntos de contacto diferentes

(materias primas entrantes, recipientes de almacenamiento, aire en los recipientes de almacenamiento, equipo, agua de enjuague, agua potable y agua para agregar a los alimentos). La irradiación ultravioleta puede y se ha utilizado en estos puntos de contacto para reducir la carga microbiana y minimizar la contaminación. Los microorganismos expuestos a la luz ultravioleta son afectados a nivel de ADN. Por lo tanto, los sistemas de reproducción dañados de las células conducen a su muerte. La exposición a la luz ultravioleta se puede aplicar en diferentes dosis para la pasteurización de alimentos líquidos o desinfección de alimentos sólidos. (Adzahan *et al.*, 2007)

Este tipo de radiación es eficaz para la inactivación de microorganismos como bacterias (formas vegetativas y esporas), mohos, levaduras, virus y protozoos. Actualmente, esta tecnología se emplea tanto para la preservación de alimentos líquidos, pero la mayor cantidad de estudios se reportan para el tratamiento de alimentos líquidos tales como soluciones azucaradas, huevo líquido y jugos de frutas, sin embargo, en leche, su utilización como método de preservación ha sido más limitada (Vásquez, 2015).

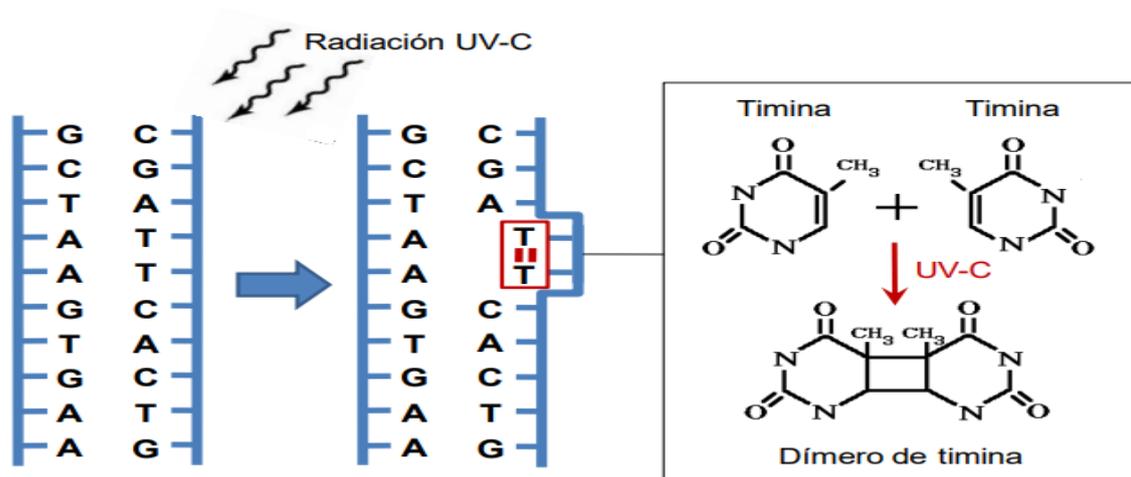
El espectro electromagnético contiene diferentes tipos de radiación de distinto poder de penetración, frecuencia y longitud de onda. La luz UV constituye parte de la radiación electromagnética en un rango de 100 a 400 nm del espectro. A su vez, este espectro se subdivide en 4 regiones:

- UV de vacío (100-200 nm): fuertemente absorbida por el agua o el oxígeno del aire. Se absorbe en unos pocos centímetros por el oxígeno del aire y conduce a la generación de ozono (O₃).
- UV-C (200-280 nm): es absorbida por el ADN y ARN de los microorganismos y conduce a su inactivación, es la radiación de mayor interés en la elaboración de alimentos, debido a su efecto germicida.
- UV-B (280-315 nm): región perjudicial para el ser humano, debido a que puede causar quemaduras en la piel y daño directo al ADN de las células, sin embargo, esta fracción de la luz UV es la que induce la formación de la vitamina D en la piel.
- UV-A (315-400 nm): Constituye el 98,7% de la radiación proveniente del sol que alcanza la superficie de la tierra. Es capaz de provocar daño indirecto al ADN de las células (Vásquez, 2015).

Mecanismo de acción

El principal mecanismo por el que se produce la inactivación es la formación de dímeros de bases pirimidínicas adyacentes en la cadena de ADN, fundamentalmente de timina, que impiden el desdoblamiento de la doble hélice durante el proceso de duplicación celular (Figura 2.2.12-1). La región UV-C que posee una longitud de onda de 200-280 nm, es la principal causante de estas lesiones en el material genético (Fernández *et al.*, 2015).

Figura 2.2.12-1. Formación de dímero de timina en el ADN por daño fotoquímico, producido por la radiación UV-C (Tomado de Fernández *et al.*, 2015).



Otros efectos asociados con la inactivación UV están relacionados con cambios en la permeabilidad de la membrana celular, con la consiguiente pérdida de electrolitos, aminoácidos y carbohidratos (Barbosa *et al.*, 2010).

Los pulsos de luz constituyen una versión modificada y mejorada de la tecnología UV en continuo, con la que se consigue emitir una mayor cantidad de energía y reducir sustancialmente el tiempo de exposición. Este tratamiento consiste en la aplicación sucesiva de destellos intensos de amplio espectro (de 200 a 1.100 nm) y corta duración (10^{-3} a 10^{-2} milisegundos) (Fernández *et al.*, 2015).

El material a esterilizar se expone como mínimo a un pulso de luz con una densidad de energía en el intervalo de 0,01 a 50 J/cm² en la superficie, usando una distribución de longitudes de onda, de tal manera que por lo menos un 70% de la energía electromagnética se distribuya en un intervalo de longitudes de onda de 170 a 2600 nm. La duración de los pulsos varía entre 1 a 0,01, a una tasa de 1 a 20 rayos por segundo. Para la mayoría de las aplicaciones, pocos rayos aplicados en fracciones de segundo suministran un alto nivel de

inactivación microbiana. (Fernández *et al.*, 2001). Cada pulso se genera mediante la acumulación de energía en un condensador y su liberación rápida a una lámpara que contiene gas que, al ionizarse súbitamente, produce un destello intenso. La luz emitida se compone aproximadamente de un 30-40% de radiación UV, correspondiendo el resto aproximadamente a partes iguales de radiación infrarroja y luz visible. La intensidad de la luz viene definida por el parámetro fluencia, que es la energía recibida por unidad de superficie o volumen. El límite de fluencia que establece la FDA para el tratamiento de los alimentos es de 12 J/cm² (Fernández *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha demostrado la efectividad del procesamiento de leche cabra con luz UV-C a altas concentraciones (15,8 mJ/cm²) para la reducción de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* obteniendo una reducción de 5 Log. (Vásquez, 2015; Barbosa *et al.*, 2010).

Los microorganismos son inactivados por la luz UV-C como resultado del daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos. La radiación UV-C es absorbida por los nucleótidos, los bloques constitutivos del ADN y ARN de la célula, según la longitud de onda, con los valores más altos cerca de 200 y 260 nm. En estudios sobre la inactivación de microorganismos con luz UV-C, los más resistentes parece ser mohos y levaduras; esto debido a los pigmentos protectores presentes. En general, la resistencia a la radiación UV-C sigue el patrón: Gram negativos < Gram positivos ≈ levaduras < esporas bacterianas < esporas de moho < virus (Vásquez, 2015). La razón por la que algunos mohos y levaduras sean más resistentes a la luz UV-C, se debe a los pigmentos presentes en algunos microorganismos. Por ejemplo, en las cepas de *Aspergillus niger*, que contienen pigmentos oscuros, la resistencia a la luz UV es mayor que en los moldes sin pigmentos oscuros (Barbosa *et al.*, 2010).

Un factor clave en la eficacia del tratamiento con pulsos de luz es la topografía del producto, ya que la presencia de irregularidades o grietas en la superficie puede crear zonas de sombra que protejan a los microorganismos de la luz. Los factores críticos que influyen en la eficiencia de la luz ultravioleta se incluyen la transmisividad del producto, el coeficiente de absorbancia, la geometría, la potencia y el perfil de flujo del producto, entre otros. Dado que la opacidad de la leche limita la penetración de UV-C, la mayoría de los microorganismos no pueden recibir la misma dosis. El coeficiente de absorción (cm⁻¹) para la leche cruda es 290 a 253.7 nm, para el agua 0.01; en otras palabras, la penetración del 90% de luz UV-C en agua es de 100 cm, para la leche cruda es de solo 0.003 cm. Además, la presencia de proteínas y glóbulos de grasa en la leche puede comportarse como una sombra, protegiendo a los

microorganismos de la radiación UV. Sin embargo, si se usa un sistema de fluido turbulento que tiene flujos de alta velocidad, lo que permite un mayor tiempo de exposición a la radiación UV, se logra una mezcla de todo el fluido, dando a la luz UV una opción para pasteurizar la leche. (Fernández *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2010).

A pesar de que la luz UV-C se aplica más eficientemente para líquidos transparentes, algunos estudios demuestran la inactivación eficiente de algunos microorganismos de relevancia tales como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en leche (Vásquez, 2015). Se logró una reducción de *Listeria monocytogenes* superior a 5 log cuando la leche de cabra se expuso a una dosis UV acumulada de $15,8 \pm 1,6$ mJ / cm² (Adzahan *et al.*, 2007).

Luz Infrarroja.

Este tipo de radiación forma parte del espectro electromagnético con una amplitud de onda que va desde los 0.5 a los 1000 μ m. Aunque el infrarrojo es actualmente utilizado para otras aplicaciones, algunos estudios relacionados con la inactivación microbiana en alimentos han demostrado los efectos de esta radiación en el ADN, el ARN y otros componentes celulares de las bacterias. Algunas de las bacterias estudiadas bajo el tratamiento infrarrojo son *Escherichia coli* O157: H7, bacterias ácido lácticas, coliformes y *Staphylococcus aureus*, que mostró inactivación total en la leche después de 4 min con una lámpara a 619 ° C. (Adzahan *et al.*, 2007).

Ventajas y desventajas de los pulsos de luz de alta intensidad

Algunas de las ventajas importantes de la utilización de luz UV-C como método de preservación son: es una tecnología limpia, no genera residuos químicos ni radioactividad residual en el producto, bajo costo de inversión, funcionamiento y mantenimiento. Escasa o nula elevación de la temperatura, que no causa daño térmico al producto. Por otro lado, en cuanto a las limitaciones de la utilización de luz ultravioleta, debe tenerse en cuenta que la inactivación de microorganismos, es dependiente de la dosis de luz aplicada, la transmitancia (cantidad de energía que atraviesa un cuerpo por unidad de tiempo) y la composición del alimento. El poder de penetración de la luz UV disminuye cuando se tratan líquidos opacos y/o tienen sólidos en suspensión. La baja transmitancia está asociada a la concentración inicial de microorganismos, partículas en suspensión, color y composición del producto. Además, la luz UV-C no es muy eficaz en alimentos de superficies porosas y rugosas, ya que sirven de escudo a los microorganismos frente a la luz UV. En cuanto a los cambios organolépticos que pudiera introducir el uso de la radiación ultravioleta, es conocido que

promueve la oxidación de lípidos en carne y leche a través de reacciones fotoquímicas. El uso de dosis acumuladas para inactivar microorganismos, puede generar cambios indeseables en la leche, tales como oxidación y rancidez. De igual manera, debido a la opacidad de la leche, se limita la penetración de la luz UV-C y, por lo tanto, la mayoría de los microorganismos no pueden recibir la misma dosis de radiación; además, la presencia de proteínas y glóbulos de grasa en la leche puede comportarse como una sombra, protegiendo estos microorganismos de la radiación ultravioleta. (Vásquez, 2015) Además, los pasteurizadores UV no ocupan mucho espacio en el piso y las pérdidas de ácido ascórbico, tiamina, riboflavina y piridoxina debido a la exposición a los rayos UV a 14 mJ / cm² son comparables a las de los jugos tratados térmicamente. (Adzahan *et al.*, 2007) Aunque no se encuentra bien estudiado, algunas reacciones de fotodegradación podrían ocurrir en la leche (Vásquez, 2015). Al utilizar ésta dosis “acumulada” de radiación UV (15.8 mJ / cm²) en la leche de cabra, se puede generar cambios indeseables en la leche, como olores desagradables por la rancidez oxidativa e hidrolítica (Vásquez, 2015; Barbosa *et al.*, 2010).

2.3 Combinación de procesos de conservación.

La optimización del empleo de los métodos de conservación pasa por el diseño de “procesos combinados”, en los que la asociación o aplicación simultánea de varios procedimientos permita potenciar el efecto, de cada uno de ellos, en los microorganismos patógenos y alteradores y reducir el impacto adverso en las características de los alimentos tratados (Silva, 2009). Por lo tanto, el patógeno con la mayor resistencia a un tratamiento podría no serlo al aplicarle otro tratamiento, es decir, por ejemplo, que la bacteria más resistente al tratamiento térmico podría no ser la más resistente a la sonicación. Por ello, se requiere de mayor investigación para definir el patógeno de referencia específico para cada tecnología. El objetivo de las tecnologías combinadas o de obstáculos, es seleccionar y combinar factores de preservación o barreras de forma tal que la estabilidad y seguridad microbiológica puedan ser garantizadas, reteniendo las características nutritivas y la aceptación sensorial (Vásquez, 2015).

Generalmente se observa una mayor inactivación microbiana cuando se aplican tratamientos no térmicos a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. La combinación de temperaturas moderadas con procesos no térmicos es de gran interés práctico, porque la aplicación de tratamientos no térmicos a temperaturas que no afectan las propiedades de los alimentos puede causar una inactivación microbiana equivalente a intensidades de tratamiento no térmico más bajas y/o por períodos de tiempo más cortos. (Raso *et al.*, 2015)

2.3.1 Termosonicación.

Debido a los inconvenientes causados por el uso de temperaturas superiores a los 80 °C que puede provocar cambios físicos, químicos y biológicos indeseables en los alimentos líquidos el uso la tecnologías emergentes como la termosonicación, la cual combina calentamiento moderado con temperaturas que van de los 37 a 75 °C con el uso del ultrasonido con frecuencias de los 20 kHz a 10 MHz, representa una técnica alternativa para evitar cambios indeseables y favorecer la inactivación de enzimas y microorganismos causales del deterioro de este tipo de alimentos. La acción de la termosonicación provoca el proceso de cavitación, el cual genera burbujas de vapor por los cambios de presión que después explotan generando calor y presión, dando como resultado una esterilización localizada y disrupción celular. (Rodriguez *et al.*, 2021)

Algunos estudios en células sometidas a termosonicación han observado que hay una serie de efectos físicos en la membrana celular, principalmente perforaciones, picaduras y gránulos de superficie; además que cuando la intensidad del tratamiento aumentaba, las células se dividían en varias partes. Estudios han demostrado la inactivación de *Escherichia coli* K12DH5 en leche tratada por UHT y sonicación. La combinación del mismo tratamiento térmico con ultrasonido redujo el valor Decimal de 77 s a 23 s (Barbosa *et al.*, 2010). En estudios realizados con *Listeria monocytogenes* en leche descremada, el valor de reducción decimal se redujo de 2.1 min (tratamiento térmico) a 0.3 min usando ultrasonido en combinación con calor; un tratamiento conocido como termo-sonicación. De igual manera, los estudios sobre la leche UHT con *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, han demostrado que la inactivación de las bacterias después de 30 minutos de tratamiento, con una disminución de casi 5 reducciones logarítmicas en la leche sin grasa, mientras que se lograron hasta 2,5 log reducciones en la leche entera (Barbosa *et al.*, 2010).

Estudios realizados con *L. monocytogenes* en leche descremada mostraron que el valor de reducción decimal D 60°C disminuyó de 2,1 minutos, al aplicar únicamente el tratamiento térmico, a 0,3 minutos al combinar el calentamiento con la sonicación. De igual forma, al estudiar la inactivación de *E. coli* en leche UHT el valor D disminuyó de 77 a 23 segundos como resultado de la aplicación de la termosonicación (Lara, 2015).

También se ha observado que al aplicar un tratamiento térmico a 40, 47 y 54 °C durante 4 minutos la reducción de *E. coli* era despreciable, pero al combinarlo con sonicación se obtuvo una reducción de aproximadamente 4 log y al utilizar la manotermosonicación obtuvieron una reducción de 5 log en 0,5 minutos. También mediante la termosonicación se redujo en un 43

% el valor de reducción decimal de *Staphylococcus aureus* en leche cruda en comparación con utilizar el tratamiento térmico convencional. También se reporta que la reducción del recuento total de leche cruda resultó mayor conforme se aumentó la temperatura del tratamiento de termosonicación (Lara, 2015).

Los cultivos elaborados con leche termosonicada tuvieron valores de pH, firmeza de gel y viscosidad más altos y mayor capacidad de retención de agua que los elaborados con procedimiento convencional. Asimismo, la microestructura de las leches termosonicadas mostró que éstas tienen una red que presenta una naturaleza más porosa y un tamaño de partícula promedio más pequeño ($< 1 \mu\text{m}$) en comparación a los yogures convencionales. Los resultados se atribuyeron a cambios en las interacciones proteína–proteína y proteína–lípidos que impulsaron la mejora de la firmeza sobre los yogures convencionales, también a que se pudo promover una unión mejorada de agua dentro de la red tridimensional con efectos benéficos sobre la capacidad de retención de agua. (Velazco, 2017)

Almanza–Rubio *et al.*, (2016) realizaron un estudio sobre la modificación de propiedades texturales y reológicas de queso crema a partir de leche termosonicada. Los resultados principales mostraron que la termosonicación de la leche redujo el tamaño de los glóbulos de materia grasa aumentando el contenido de grasa y el rendimiento del queso crema. Además, la termosonicación de leche mejoró significativamente la termoestabilidad del queso crema. Los autores determinaron que los resultados obtenidos se deben a la cavitación acústica que conlleva a la producción de fuerzas físicas fuertes como cavitación, cizalladura, turbulencia y generación de calor. Así, estas fuerzas reducen el tamaño de los globulos grasos y también pueden alterar la membrana de glóbulo graso modificando la habilidad de estos para interactuar entre ellos y con caseínas.

La termosonicación se ha usado exitosamente en la inactivación de células de *Lactobacillus acidophilus* y *E. coli* K12 DH5 y esporas de *Bacillus stearothermophilus* (Hernandez, 2015), por otro lado, se ha visto que el tratamiento con sonda de ultrasonido a 20 kHz, nivel de potencia del 100%, potencia acústica de 150 W, intensidad acústica de 118 W / cm^2 combinado con calor suave (57°C) durante 18 min dió como resultado una reducción de 5 log de *L. monocytogenes* y en temperaturas ultra altas una reducción de 5 log en el total de bacterias aeróbicas en la leche cruda. (Adzahan, 2007). Para el caso de leche entera cruda, después de ser pasteurizada a 63°C y 120 μm de ultrasonido por 30 minutos, el crecimiento mesofílico fue inferior a 2 log después de 16 días a 4 ° C. (Barbosa *et al.*, 2010).

En leche, se ha reportado que la termosonicación afectan macrocomponentes (reducción de tamaño de glóbulos de grasa, desnaturalización parcial de proteínas) que a su vez ocasionan modificaciones en propiedades funcionales de diversos productos elaborados con ella. Con frecuencia, la magnitud de desnaturalización proteica que ocasionan los procesos a los que se somete la leche condiciona el uso final que se le puede dar a esta materia prima. (Rodríguez *et al.*, 2021)

2.3.2 Manotermosonicación

La manosonicación que combina la ultrasonificación con presiones moderadas entre 100 y 300 kPa. El uso de manosonicación también ha logrado importantes reducciones en la inactivación de *Listeria monocytogenes* en leche descremada Usando la presión ambiental, el valor de reducción decimal para *Listeria monocytogenes* en leche descremada fue de 4.3 min, Con el tratamiento con ultrasonido; aumentando la presión hasta 200 kPa, se redujo a 1,5 min; y usando la presión a 400 kPa, se redujo el valor D a 1.0 min. Cuando la temperatura se incrementó por encima de 50 ° C, la letalidad de la ecografía en las células de *L. monocytogenes* se incrementó (Barbosa *et al.*, 2010).

La aplicación de tratamientos de manotermosonicación de la leche puede realizarse en un reactor en flujo continuo o en discontinuo, debiendo estar el reactor presurizado a 2-3 kg y equipado con transductor o transductores de ultrasonidos capaces de operar a 20 Khz. La temperatura debe mantenerse lo más baja posible para evitar la interferencia de modificaciones térmicas de las proteínas. En función del diseño del reactor, los tiempos de residencia deberán variar, pero pueden ser tan bajos como unos pocos segundos (10-12 seg). El tratamiento de manotermosonicación debe estar situado inmediatamente antes de la inoculación de la leche, o de la mezcla de leche y sólidos lácteos con el starter adecuado. Se ha podido comprobar que sometiendo leche no homogeneizada con un contenido de grasa del 1,6% a tratamientos de manotermosonicación (40°C, 117 µm de amplitud y 20 kHz de frecuencia ultrasónica, 12 segundos) se mejoran las características reológicas de los yogures, comparadas con las de yogures producidos con leches control sometidas a homogeneización. (Perea *et al.*,2014)

2.3.3 HHP y Temperatura

Se ha demostrado a escala de laboratorio que la combinación de HHP con temperaturas moderadas es un medio eficaz para aumentar la inactivación microbiana. Sin embargo, la

aplicación de esta combinación a escala industrial podría encontrar algunas limitaciones técnicas. Una de las principales ventajas del proceso HHP es el hecho de que el tratamiento es homogéneo porque la presión se transmite de manera uniforme e instantánea dentro del recipiente a presión. Como la transmisión de calor no tiene estas propiedades, la aplicación de tratamientos uniformes cuando los tratamientos HHP se combinan con calentamiento moderado resulta en un desafío técnico. (Raso *et al.*, 2015)

Tabla 2.3-1. Combinaciones de HHP y temperaturas moderadas para alcanzar una inactivación de al menos 5 ciclos log₁₀ en diferentes microorganismos patógenos vegetativos y esporulados (Tomado Raso *et al.*, 2015)

Microorganismo	Medio	Tratamiento	°C	Reducción logarítmica
<i>L. monocytogenes</i>	UHT milk	375 MPa/15 min	45	>7.0
<i>E. coli</i> O157 H7	UHT milk	400 MPa /15 min	50	6.0
<i>S. typhimurium</i>	Peptona	276 MPa/15 min	25	5.5
<i>S. aureus</i>	UHT milk	400 MPa /15 min	50	5.0
<i>B. coagulans</i>	Sodio fosfato tampón (pH 8)	400 MPa/30 min	55	5.0
<i>B. stearothermophilus</i>	Tampón de fosfato (pH7)	700 MPa/5min	70	5.0
<i>B. cereus</i>	Tampón de fosfato (pH7)	700 MPa/5min	50	>5.0
<i>B. licheniformis</i>	Tampón de fosfato (pH7)	700 MPa/5min	60	5.0

2.3.4 PEF y temperatura

La mayor resistencia microbiana a PEF se observa a temperaturas cercanas a 0°C y se observa un mayor nivel de inactivación microbiana al aumentar la temperatura de tratamiento. La mayor susceptibilidad de los microorganismos vegetativos al PEF a mayores temperaturas se ha relacionado con el efecto de la temperatura sobre las propiedades de la membrana. Se ha sugerido que el incremento en la fluidez de la membrana y la reducción asociada en el grosor de la bicapa a temperaturas más altas pueden hacer que la membrana celular sea más susceptible a la ruptura dieléctrica causada por los tratamientos con PEF. (Raso *et al.*, 2015)

La resistencia microbiana al PEF es extremadamente variable. Para los microorganismos más resistentes, para obtener una inactivación microbiana sustancial por PEF a temperatura ambiente es necesario aplicar tratamientos de larga duración o a muy altas intensidades de

campo eléctrico. Existen varias limitaciones técnicas y económicas para aumentar la escala de la cámara de tratamiento a una mayor capacidad para aumentar el tiempo de residencia o para aplicar intensidades de campo eléctrico superiores a 30 kV/cm. Aplicación de tratamientos PEF en las temperaturas moderadas introducen la posibilidad de pasteurizar alimentos líquidos mediante tratamientos cortos a intensidades de campo eléctrico moderadas. Desde un punto de vista práctico, la alimentación se puede aumentar la temperatura aumentando la temperatura de entrada y aprovechando la energía térmica disipada en el alimento como consecuencia de su resistencia al paso de la corriente. (Raso *et al.*, 2015)

Algunos autores han demostrado que un aumento moderado de la temperatura de tratamiento disminuye también la cantidad de energía necesaria para lograr un mismo grado de inactivación microbiana, debido a los cambios en los componentes de la membrana inducidos por la temperatura (Silva, 2009).

2.3.5 UV-C, vacío y pasteurización.

Vásquez, (2015), confirmó que la leche tratada con UV-C (4,3 kJ/m²) en combinación con la pasteurización (73,5°C por 15s) y demostró que, si a la leche cruda se le aplicaba un vacío, se logra una mayor reducción en bacterias aerobias mesófilas de hasta 3 logarítmico, además de la no detección de coliformes en los tratamientos aplicados (pasteurización, UV-C y UV-C en combinación con pasteurización).

2.3.6 Termorradiación

Se ha propuesto la irradiación en combinación con temperaturas moderadas para obtener la letalidad requerida mientras se preserva la calidad de los alimentos. Se ha investigado el efecto de inactivación de un tratamiento térmico antes de la irradiación, calor e irradiación aplicados simultáneamente (termorradiación) e irradiación antes de un tratamiento térmico. Si bien el efecto de inactivación de un tratamiento térmico seguido de irradiación fue aditivo, se ha observado un efecto sinérgico en los tratamientos de termorradiación o cuando se aplicó un tratamiento térmico después de la irradiación. Mediante termorradiación se logró un efecto sinérgico sobre la inactivación de bacterias vegetativas y esporas bacterianas suspendidas en medios de laboratorio o alimentos. (Raso *et al.*, 2015)

La aplicación de la irradiación y el tratamiento térmico pueden afectar el sabor, desde ligeramente caramelizado hasta muy oxidado, mientras que el color se vuelve más blanco después del procesamiento. El uso de temperaturas de congelación en combinación con la irradiación puede reducir los problemas de sabor tostado, caramelizado o gelificación, aunque se puede detectar un sabor amargo. El uso de dosis más bajas de irradiación (20 kGy) en combinación con vacío e irradiación puede ser eficaz en el procesamiento de la leche sin cambios importantes en las características sensoriales (Barbosa *et al.*, 2010). En un estudio realizado en tres tipos de leche (vaca, búfalo y cabra), se observó la inactivación de microorganismos bacterianos y formadores de esporas después de combinar la irradiación con rayos gamma y el tratamiento térmico (70 ° C durante 15 s) (Barbosa *et al.*, 2010).

En un estudio con irradiación con rayos gamma en combinación con tratamiento térmico (70°C durante 15 s) para pasteurizar la leche, la disminución de la vitamina A y el caroteno. El contenido se observó al aumentar la dosis de irradiación (Barbosa *et al.*, 2010).

2.3.7 Bacteriocinas, HHP, PEF y pasteurización

El uso de antimicrobianos naturales con otra técnica de conservación de alimentos da grandes beneficios de cada técnica reduciendo el tiempo y la cantidad de cada uno. Por esta razón, la aplicación de temperaturas moderadas, tratamiento con HHP y PEF y/o la preservación de los productos alimenticios en frío juegan un papel importante en la inhibición de microorganismos (Valero *et al.*, 2003). Desde que se conoce que las HHP causan daño en la membrana celular, se sugiere que esta tecnología y la adición de antimicrobianos naturales tienen el mismo órgano blanco en las células bacterias, obteniéndose así un efecto sinérgico. El uso de PEF, puede ser combinada con algunos agentes antimicrobianos como la nisina o la lisosima, (Chandan *et al.*, 2008).

La combinación de antimicrobianos con tecnologías no térmicas mejora el efecto de inactivación de los tratamientos no térmicos y amplía el espectro de acción de algunos antimicrobianos con ventajas en la estabilidad y seguridad del producto. Sin embargo, no se ha investigado el efecto inhibitorio de los antimicrobianos sobre el crecimiento de los microorganismos que sobreviven al tratamiento.

Se observa una inactivación creciente cuando las bacterias vegetativas se presurizan en presencia de péptidos antimicrobianos naturales como la nisina, la lisozima y la pediocina. Sin embargo, esta mayor inactivación se ha observado tanto en bacterias Gram+ como Gram-

La sensibilización a HHP de las bacterias Gram – se ha atribuido a la permeabilización de la membrana externa durante el tratamiento HHP. La sensibilización a la lisozima y la nisina es transitoria, tan pronto como se libera la presión, los microorganismos se vuelven resistentes a estos antimicrobianos. Los mutantes resistentes a la presión de *E. coli* suspendidos en tampón de fosfato o leche descremada también se sensibilizaron a la nisina y la lisozima. Se consiguió una inactivación más eficaz de estos mutantes mediante un tratamiento de presión cíclica en comparación con un tratamiento continuo en las mismas condiciones. Un tratamiento de presión pulsada también mejoró el efecto de inactivación de HPP en combinación con lisozima y nisina en cepas de *E. coli* suspendidas en la leche. Desafortunadamente, no todas las bacterias gramnegativas se sensibilizan a la lisozima mediante tratamientos con HHP. (Raso *et al.*, 2015)

La nisina ha sido el antimicrobiano más estudiado en combinación con PEF. Se ha demostrado que la presencia de nisina en el medio de tratamiento aumenta el efecto de inactivación del PEF tanto para bacterias Gram+ como Gram-. Se ha observado un efecto sinérgico cuando las bacterias se incuban con nisina después del tratamiento con PEF, cuando la nisina está presente durante el tratamiento con PEF o cuando se agrega nisina a la suspensión bacteriana después del tratamiento con PEF. (Raso *et al.*, 2015). Sarmiento (2007), observó que la pasteurización de leche fluida, sin nisina, no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento de bacterias ácido lácticas en comparación con los tratamientos pasteurizados y con nisina. La adición de nisina a razón de 50 ppm logró conservar la leche por 8 días más en comparación de la leche únicamente pasteurizada, sin cambios significativos en las características organolépticas.

Se observó un fuerte efecto de inactivación sinérgica para cuatro cepas de *Listeria innocua* mediante el uso combinado de alta presión hidrostática y el sistema de lactoperoxidasa aplicados simultáneamente. Sin embargo, esta combinación no influyó en la resistencia a HHP de cuatro cepas de *E. coli*. (Raso *et al.*, 2015)

También se ha investigado la inactivación microbiana por HHP en presencia de varios antimicrobianos. Se produjo una inactivación adicional que osciló entre 1,3 y 1,5 log₁₀ ciclos cuando *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* o *E. coli* se presurizaron a 345 MPa a 25 °C durante 10 min en presencia de una mezcla de pediocina AcH (3.000 UA/ml) y nisina (3.000 UA/ml). Una combinación de antimicrobianos con un tratamiento HHP moderado a temperaturas suaves permitió obtener una inactivación sustancial de varios microorganismos patógenos y de descomposición. Un tratamiento de 450 MPa a 45-50°C durante 5 min en presencia de pediocina AcH (3000 AU/ml) inactivó en más de 8-log₁₀ ciclos la población de

Staphylococcus aureus, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Lactobacillus sake*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*. La inactivación adicional del tratamiento en presencia del antimicrobiano fue de 3 a 4 log10 ciclos. (Raso *et al.*, 2015)

Tabla 2.3-2 Combinación de tecnologías no térmicas con otros métodos de preservación combinados o sucesivo (Tomado y adaptado de Raso *et al.*, 2015)

	Altas presiones hidrostáticas	Campos eléctricos pulsantes	Ultrasonido	Irradiación
Temperaturas moderadas	Aumenta la letalidad del tratamiento	Aumentar la letalidad del tratamiento	Termoultrasonificación: Disminuye la resistencia al calor de las esporas	Termorradiación Efecto sinérgico
Bajo pH	Aumenta la letalidad del tratamiento. Inhibición del crecimiento microbiano	Aumenta la letalidad del tratamiento / Inhibición del crecimiento microbiano	Sin efecto	Sin efecto
Bajo aw	Efecto antagónico	Efecto antagónico	Efecto antagónico	Efecto antagónico
Antimicrobianos	Aumentar la letalidad del tratamiento	Aumentar la letalidad del tratamiento	Sin efecto	Sin efecto
Baja temperatura	Aumento de la letalidad de HHP / Inhibición del crecimiento microbiano	Inhibición del crecimiento microbiano	Sin efecto	Inhibición del crecimiento microbiano
Baja temperatura y atmósfera modificada	Inhibición del crecimiento microbiano	Sin efecto	Sin efecto	Inhibición del crecimiento microbiano
Altas presiones hidrostáticas		Aumenta la letalidad del tratamiento	ManoTermosonicaclón. Efecto aditivo en células vegetativas, Efecto sinérgico en esporas bacterianas	
Irradiación	Disminuye la resistencia de las esporas a HHP Disminuye la resistencia de las esporas a la irradiación			

2.4 Inactivación de enzimas relacionadas con la calidad alimentaria por combinación de tecnologías no térmicas con otros factores de conservación

En algunos alimentos, la intensidad de los tratamientos térmicos está determinada por la alta termotolerancia de ciertas enzimas más que por la termotolerancia microbiana. Por lo tanto, las técnicas para inactivar enzimas en alimentos a temperaturas reducidas son de interés en la industria alimentaria para producir alimentos estables de alta calidad. (Raso *et al.*, 2015)

La resistencia enzimática a las tecnologías no térmicas varía considerablemente y, en general, las enzimas son muy resistentes a estos tratamientos. Debido a la estabilidad extrema de las enzimas relacionadas con la calidad de los alimentos a los tratamientos no térmicos, se ha investigado una combinación de estos tratamientos con otros factores de conservación para mejorar el efecto de inactivación. Las combinaciones de presión con temperaturas moderadas aumentaron el nivel de inactivación enzimática, pero en algunos casos se ha informado un aumento de la actividad enzimática. Aunque los estudios realizados en esta materia han mostrado resultados variables, en general las enzimas parecen ser más resistentes al PEF que los microorganismos vegetativos. Hay datos limitados disponibles sobre la combinación de tratamientos con PEF con otros factores de conservación para mejorar la inactivación enzimática. En general, las enzimas son mucho más resistentes a la irradiación que los microorganismos. Las dosis requeridas para inactivar las enzimas a menudo resultan en cambios indeseables en la calidad de los alimentos o están por encima de los límites aceptables. No se ha investigado una combinación de irradiación con otros factores de conservación para mejorar la inactivación enzimática. La alta resistencia de las enzimas endógenas a los tratamientos no térmicos, incluso en combinación con otros factores de conservación, indica la necesidad de combinar tecnologías no térmicas con otras técnicas que inhiben la actividad enzimática, como el almacenamiento a baja temperatura, para mantener la calidad y prolongar la vida útil de los alimentos. (Raso *et al.*, 2015)

En general, el tratamiento de la leche por UHPH produce inactivación de las enzimas nativas de la leche (lactoperoxidasa, lipasa, plasmina y fosfatasa alcalina) en proporciones variables. Estas variaciones podrían explicarse por las diferencias en las máquinas y el diseño y construcción de la válvula, así como la temperatura de entrada y tiempo en el que la leche alcanza la más alta temperatura en el equipo UHPH (Trujillo *et al.*, 2016). El tratamiento UHPH (300 MPa, $T_i = 30$ y 40 °C) aplicado a la leche produce una disminución de la actividad enzimática de la plasmina y plasminógeno (sistema enzimático con importancia ya que

delimita la vida útil de las leches UHT, y ejerce una importante actividad proteolítica en los quesos madurados) en comparación a las muestras de leche cruda. (Mayta *et al.*, 2020)

Discusión

Algunas técnicas por calor podrían tener un gran alcance a futuro como lo son la ohmnización y la inducción electromagnética gracias a su capacidad para que el calor se transfiera de forma más uniforme al producto; lo que no hacen las formas convencionales como la pasteurización clásica y la esterilización, por otro lado las tecnologías no térmicas, si bien también pueden conservar de buena manera muchas de las características organolépticas originales, requieren ser complementadas con algún otro proceso, ya sea por el factor económico o para asegurar la inocuidad del producto

Lamentablemente, dentro del campo de investigación sobre tecnologías alternativas para la conservación de la leche, al día de hoy, no se encuentran muchos datos recientes. Eso lo podemos confirmar dado que muchas de las fuentes recientes existentes, ya han sido citados previamente por otros autores, lo que indica que no se han hecho muchos nuevos estudios sobre las diferentes tecnologías o solo se han utilizado las que se han visto que tienen mejor potencial como son los campos eléctricos pulsantes, las altas presiones hidrostáticas, las membranas de microfiltración y los pulsos de luz de alta intensidad principalmente.

Una de las principales desventajas de los tratamientos no térmicos sigue siendo la falta de aprobación por las instituciones gubernamentales para su aplicación en producto para consumo humano; así mismo, hace falta que los consumidores acepten estas nuevas tecnologías, ya que puede existir una desinformación del proceso arraigada a otras creencias; como es el caso en la aplicación de la radiación e inducción electromagnética en los alimentos, lo que hace que el producto no sea muy bien visto por los consumidores. Es por ello, que la investigación es necesaria para establecer las mejores combinaciones de tratamientos y favorecer la preservación de leche por más tiempo, manteniendo siempre la calidad del producto, manteniendo lo más posible las características organolépticas propias, al menor costo.

Tabla comparativa entre los diferentes métodos de conservación

Tratamiento	Mecanismo de acción	Ventajas	Desventajas	Limitantes
Pasteurización	Desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidativos irreversibles	Bajo costo de procesos y fácil operación.	Formación de reacciones Maillard y cambios de sabor.	Solamente puede eliminar formas vegetativas de microorganismos
Esterilización (UHT)	Rupturas de cadena única en el ADN, pérdida de la integridad funcional de la membrana citoplásmica, activación de ribonucleasas, degradando el ARNr	No deja residuos tóxicos, hay un bajo deterioro del material expuesto y es económico	Puede llegar a generar características indeseables en el producto	Las enzimas resentes en la leche pueden llegar a reactivarse después de mucho tiempo de almacenamiento
Deshidratación	Desecación de la célula, efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos, procesos oxidativos y fusión de membranas	No es corrosivo para metales e instrumentos y permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles	Daños al producto debido a que el raspado no es perfecto y los restos se vuelven a humedecer y a recalentar y factor económico.	Dependiendo del tipo de deshidratador, el producto final puede verse dañado, además de una fácil recontaminación del producto para algunos deshidratadores
Ohmnización	Incremento de temperatura por resistencia de los alimentos al paso de corriente alterna a través de ellos.	Generación de calor interna en el alimento sin limitación de la transferencia de calor y alta eficiencia de energía.	Puede generar sabores indeseables en el producto terminado	Solo aplicarse sólo a alimentos líquidos o con partículas sólidas en suspensión

Tratamiento	Mecanismo de acción	Ventajas	Desventajas	Limitantes
Refrigeración	Restricción en el crecimiento de microorganismos patógenos por descenso en el proceso de transporte de nutrientes y debilitamiento de los enlaces de las proteínas.	Bajo costo de operación	Solubilización de las caseínas, particularmente la beta-caseína	Selectividad del tratamiento en los microorganismos
Congelación	Disminución de la actividad fisicoquímica y bioquímica del agua y de las reacciones enzimáticas y no enzimáticas	Bajo costo de operación en congelación lenta	Inestabilidad proteica que se caracteriza por la floculación, es decir, la agregación física de las micelas de caseína	El tiempo de congelación se verá afectado según la forma que tenga el contenedor del producto y la forma en que se realice la congelación
Radiofrecuencia	El calor se genera dentro del producto, como resultado de la polarización de las moléculas y la migración de iones que se produce a alta frecuencia	Radiofrecuencia sobre la energía de microondas es que la profundidad de penetración es mayor debido a la alta frecuencia.	Pueden formarse sabores indeseados si se prolonga por mucho tiempo el proceso	El producto necesita estar en una película de polietileno o rodeado de agua para evitar cambios organolépticos
Inducción electro magnética	Desnaturalización de proteínas y pared celular	Vida de almacenamiento mayor y sin la formación de sabores por reacción Maillard	Desigualdad en la distribución de la temperatura durante todo el proceso	Aún no se encuentran establecidos los límites necesarios para su comercialización
Termización	Promueve la germinación de esporas bacterianas para su destrucción por pasteurización	Aumento de la vida útil sin necesidad de refrigeración después de la pasteurización	Destrucción de bacterias lácticas y enzimas en las leches fermentadas	No puede ser usada en leches con cargas bacterianas elevadas. Restringido a ciertos derivados lácteos.

Tratamiento	Mecanismo de acción	Ventajas	Desventajas	Limitantes
Sonicación	Cavitación acústica que provoca el debilitamiento y el rompimiento de las células bacterianas	Mejora la textura y aumenta el rendimiento en quesos	Se debe juntar con otros procesos	La eficacia de la sonicación por sí sola para la inactivación microbiana es baja e insuficiente.
Aditivos	Degradación en la membrana citoplasmática y pérdida del contenido intercelular	Alta efectividad contra Gram+ principalmente. En el caso de las bacteriocinas, son altamente termorresistentes.	La actividad antibacterial de los varía de acuerdo con el tipo de microorganismo.	Reacciones en la leche dependiendo del aditivo utilizado. Los microorganismos pueden llegar a generar resistencia a lantibióticos
Conservación con CO ₂	Acidificación de la leche cruda refrigerada por inyección de CO ₂ hasta un determinado pH.	No ejerce efectos adversos sobre las caseínas, proteínas del suero, ácidos orgánicos, compuestos volátiles, y vitaminas hidrosolubles y liposolubles	Coagulación por excesiva acidez y aumento de volumen del gas ocluido en la leche durante el tratamiento térmico en las plantas industriales.	Previa evaluación de la acidez de la leche para su uso. Solo destinada a ciertos derivados lácteos.
Ionización	Daño al ADN en las células bacterianas provocando mutaciones en el mismo.	Poca generación de características indeseables a bajas dosis (<10 KGy)	Sabor a "Tostado" en el producto	Dependiente de la formación de radicales por el oxígeno disponible
Altas presiones hidrostáticas	Desequilibrio osmótico por ruptura de la pared celular y desnaturalización de enzimas	No produce deterioro de nutrientes termolábiles	Imposibilidad de aplicación en algunos alimentos	Con los equipos disponibles hasta ahora en el mercado no se pueden diseñar procesos continuos

Tratamiento	Mecanismo de acción	Ventajas	Desventajas	Limitantes
Altas presiones por homogeneización	Repentina caída de presión, fuerzas de corte y de torsión, turbulencia y más probablemente la cavitación y las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de gas durante la aplicación	Aumento de la capacidad y estabilidad de la emulsión, sin afectar el valor nutricional y las características sensoriales.	se produce un marcado incremento de la temperatura del producto debido al incremento de presión	Falta de estudios y adaptación a las Normas internacionales para su uso a nivel industrial.
Pulsos eléctricos de alto voltaje	Desestabilización de la capa lipídica y las proteínas de la membrana celular; el plasma de las membranas celulares se hace permeable a pequeñas moléculas y la permeabilidad causa hinchazón y una eventual ruptura de la membrana celular.	Reduce los cambios que ocurren en las propiedades organolépticas de los alimentos. Además de conservar los atributos sensoriales de los alimentos	Alto costo del equipo, erosión de electrodos y alto consumo de energía	Pequeña capacidad de la cámara de tratamiento
Campos magnéticos oscilantes	Debilitamiento de los enlaces entre iones y proteínas de ADN provocando su ruptura	Mejora la calidad y aumenta la vida útil de los alimentos pasterizados, desnaturalización térmica mínima	Identificar los patógenos resistentes, determinar los factores críticos del proceso, validar el proceso	Su uso solo es aplicable a productos que fueron previamente envasados.

Tratamiento	Mecanismo de acción	Ventajas	Desventajas	Limitantes
Plasma no térmico	Destrucción del ADN por irradiación UV, la volatilización de los compuestos de la superficie de las esporas por los fotones UV y la erosión, también llamado "grabado" de la superficie de las esporas por adsorción de especies reactivas como los radicales libres	Práctico, rápido, no deja residuos químicos objetables ya que en ningún caso se emplean sustancias químicas extrañas	Puede acelerar el proceso de rancidez de la misma, debido a la formación de los mismos radicales libres y formas reactivas de oxígeno	Pequeña capacidad de la cámara de tratamiento, no se ha diseñado su uso para aplicación a nivel industrial.
Bactofugación	La fuerza centrífuga impulsa las bacterias y/o esporas en cada rendija hacia la periferia del recipiente y la leche reducida en bacterias se mueve hacia el eje central de la centrífuga.	Se puede emplear como complemento a tratamientos térmicos de termización, pasteurización y esterilización en la industria láctea	Requiere de equipo especializado y posee alto desgaste de piezas móviles.	No elimina la totalidad de microorganismos, siendo más efectivo para esporas.
Microfiltración	Actúa como barrera selectiva, permitiendo el paso de determinados componentes	Especificidad en tamaño para la partícula a separar del medio	Obstrucción frecuente de los poros de la membrana	Requiere de tiempos prolongados para la filtración del producto.

Conclusión

La leche, debido a su gran importancia tanto económica como alimenticia, la convierte en un alimento básico en la dieta de muchas poblaciones. Esta es la misma razón por la cual se buscan constantemente nuevos métodos para su conservación y se perfeccionan las ya conocidas.

El interés por los tratamientos no térmicos de los alimentos se ha incrementado significativamente desde las décadas pasadas. Las nuevas tecnologías son prometedoras para asegurar la inocuidad del producto y alargar su vida útil, sin embargo, como se vio en esta recopilación; de forma individual, no todas las tecnologías aseguran mantener las características intactas del producto original, así como la eliminación completa de microorganismos del producto, sino que es necesario la combinación de varias técnicas, conocido también como tecnología de barreras (hurdle technology). Esta es la razón por la cual la resistencia de un microorganismo a un cierto tratamiento variará dependiendo de cada alimento. Otro factor importante, sigue siendo el económico, ya que, si bien las tecnologías permiten obtener mejores características, el costo de producción con un cierto tipo de método, puede ser más caro que con uno térmico tradicional además de que algunos solo han sido usados para pruebas a pequeña escala en laboratorios y ni siquiera se tienen diseños para la industrialización del producto a gran escala.

Dentro de las características de un método ideal para la conservación no solo de la leche, sino de los alimentos en general se pueden considerar factores como

- Equipamiento y e insumos económicos
- Aceptación por parte de los consumidores
- Fácil aplicación
- Ausencia de residuos del tratamiento
- Sin cambios en las características organolépticas
- Sin alteraciones nutricionales del alimento.
- Que garantice la inocuidad del producto a tratar
- Inactivación de enzimas

Bibliografía

1. Adzahan M. N., Benchamaporn, P., (2007), *Potential of Non-Thermal Processing for Food Preservation in Southeast Asian Countries*. Universiti Putra, Malaysia
2. Aguilar, L. S., (2015), *Efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre distintos parámetros de proceso y sobre la calidad e inocuidad durante la elaboración de queso seco y queso Ricotta*.
3. Alcántara-Zavala, A. E., (2013), *Evaluación del tratamiento de altas presiones hidrostáticas en leche cruda de vaca como método equivalente a la pasteurización*, (Doctoral dissertation, MSc Thesis. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, QRO, MX).
4. Almanza-Rubio, J. L., Gutiérrez-Méndez, N., Leal-Ramos, M. Y., Sepulveda, D., & Salmeron, I. (2016). Modification of the textural and rheological properties of cream cheese using thermosonicated milk. *Journal of Food Engineering*, 168, 223-230.
5. Bada Gancedo, Juan Carlos; González de los Reyes-Gavilán, Clara, Ruas Madiedo, Patricia, (2000), *Procedimiento de conservación de leche cruda refrigerada con CO2 y posterior desgasificación*, Oficina española de patentes y marcas, España.
6. Barbosa-Canovas, G., & Bermudez-Aguirre, D., (2010), *Other novel milk preservation technologies: ultrasound, irradiation, microwave, radio frequency, ohmic heating, ultraviolet light and bacteriocins*. In *Improving the safety and quality of milk* (pp. 420-450). Woodhead Publishing.
7. Barbosa, G; Rodríguez, J., (2001), Review: Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. Food Australia.
8. Beristain-Bauza, S. C., Palou, E., & López-Malo, A., (2012), *Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos*. *Rev. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 64-78.
9. Calvet C. E., C. López M., Echeverría G. J. M., Jiménez G. L. M., Jubert R. A., Arias V. R. O., Palomino B. A., (2016), *Guía del asesor en la calidad de leche: Sentando las bases prácticas*, SERVET, España.
10. Calderón R, Alfonso, Rodríguez R, Virginia, & Vélez R, Sandra. (2007). *Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el municipio de montería, Colombia*. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 912-920..
11. CANILEC, (2018), *Estadísticas del sector lácteo 2010-2017.*, México.

12. Carrillo, A. C., & Cely, C. S. L., (2016), *Efectos de la inclusión de dietas ricas en flavonoides en la calidad de la leche bovina*. Revista de Medicina Veterinaria, (31), 137-150.
13. Cervantes P., (2005), *Caracterización de la composición y producción láctea en vacas de diferentes genotipos en Veracruz, México*. La Habana, Cuba.
14. Chandan R. C., Kilara A., Shah N. P., (2008), *Dairy processing & quality assurance*, Wiley-Blackwell, India.
15. Chaudhari, C.B., Prajapati, J.P., & Pinto, S.V. (2015). *Ultrasound technology for dairy industry. Proceedings of the National Seminar on "Indian Dairy Industry – Opportunities and Challenges"*. Anand, India. 151-155.
16. Cortada, A.; Rodríguez, O. (2008), *Principales métodos de conservación de leches fermentadas*, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Cuba
17. COUSILLAS BOAM Georgina, FROS PICUN Ana Carolina, LAZZARINI BELLACCI ' Florencia, (2012), *EFFECTO DE LA CONGELACION DE LECHE CAPRINA SOBRE LA CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA Y DE COMPOSICION*, UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA, FACULTAD DE VETERINARIA, URUGUAY
18. CTIC-CITA, (2011), *IV JORNADA DE INNOVACIÓN Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA*, La rioja, España
19. De Piante Vicin Daniel, Lopez Mariela, (2016), *Conservación de alimentos*, Instituto de desarrollo tecnológico para la industria química.
20. Del Castillo Lozano M., (2010), *Primer foro sobre ganadería lechera de la zona alta de Veracruz. Mejoramiento del aroma de la leche de cabra*, Universidad Veracruzana, México
21. De los Reyes Gonzales Gaspar, Molina Sánchez Baldomero, Coca Vázquez Rafael, (2010), *Calidad de la leche cruda*, Primer foro sobre ganadería lechera de la zona alta de Veracruz, México.
22. Early R., (2000), *Tecnología de los productos lácteos*, Acribia, España.
23. Elizalde, E. F., Signorini Porchietto, M. L., Canavesio, V. R., Cuatrin, A., Tarabla, H. D., & Calvino, L. F. (2009). *Medición de la conductividad eléctrica en leche como método diagnóstico de mastitis subclínica bovina*.
24. Elwood M. Juergenson, W. M., (1972), *Prácticas aprobadas en la producción de leche*. México: Compañía editorial continental.
25. Fernández García Leticia, (2012), *Producción de leche de larga duración (esl) mediante membranas cerámicas de microfiltración*,
26. Fernández, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G (2001), *Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor*.

27. Fernández, M., & Hierro, E., (2016), *Pulsos de luz: una nueva tecnología para la higienización de los alimentos listos para el consumo*. *Actas de la Real Academia Española de Ciencia Veterinarias*.
28. Feitosa Brito R. J., V.P. Brito M. A., (2018), *Qualidade Higiênica do leite*, República federativa de Brasil
29. Flores Cabrera Miluska Andrea, (2015), *Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de listeria monocytogenes inoculada en la leche pasteurizada*, Universidad nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú
30. Frazier W.C., Westhoff D. C., (1993), *Microbiología de los alimentos*, 4° edición, Editorial Acribia, España.
31. GARCIA MUÑOZ, G. U. I. L. L. E. R. M. O. (2014). *MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONSERVACION DE ALIMENTOS* (No. TX 557. G37 2010.).
32. Gésan-Guiziu, G., (2010), *Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques*. In *Improving the safety and quality of milk* (pp. 349-372). Woodhead Publishing.
33. Gómez-Sánchez A. I.; Cerón-Carrillo T. G.; Rodríguez-Martínez V.; Vázquez Aguilar. M. M.(2012), *Aspectos tecnológicos de la congelación en alimentos*, Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos, Universidad de las Américas-Puebla, Cholula, Pue., México
34. Hernández-Sánchez, H. (2015). *Aplicación de tecnologías no térmicas en el procesamiento de leche y derivados*. Barcelona, España
35. ICMSF, (1985), *Ecología microbiana de los alimentos, volumen II*, Editorial Acribia, España.
36. Jeantet Romain, Roignant Michel, Brulé Gérard, (2005), *Ingeniería de los procesos aplicada a la industria láctea*, Acribia, España.
37. Jimenez P. S, (2012), *Refrigeración de leche. Química de la leche. Coordinador y Autor*, España
38. Keating P. F., Gaona R. H, (1999), *Introducción a la lactología*, Limusa, México.
39. Lara A. S., (2015), *Efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre distintos parámetros de proceso y sobre la calidad e inocuidad durante la elaboración de queso seco y queso Ricotta*.
40. Mansel, G. W., (2010), *Improving the safety and quality of milk*. New York: woodhead publishing.
41. Matak, K. E.; Sumner, S. S; Duncan, S. E.; Hovingh, E.; Worobo, R. W.; Hackney, C. R. & Pierson, M. D., (2007), *Effects of Ultraviolet Irradiation on Chemical and Sensory Properties of Goat Milk*. *Journal of Dairy Science*, 90: 3178–3186.

42. Mayta-Hancco, Jhony, Trujillo, Antonio-José, & Juan, Bibiana. (2020). La homogeneización a ultra-alta presión (UHPH): Efectos en la leche y aplicaciones en la fabricación de quesos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*
43. NMX-F-700-COFOCALEC-2004, (2004), Sistema producto leche – alimento – lácteo - leche cruda de vaca - especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.
44. La NOM-155-SCFI-2012, (2012), NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, México
45. NOM-243-SSA1-2010, (2010), *Leche, fórmula láctea, producto lácteo y derivados. Métodos prueba*, México.
46. Orrego Alzate Carlos Eduardo, (2018), *CONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE ALIMENTOS*, Universidad Nacional de Colombia, Colombia
47. Oblitas Cruz Jimy, (2018), *Tecnologías emergentes en la preservación de alimentos – Revisión*, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, Perú
48. Ortiz Padilla Álvaro, (2015), *Efecto de la Bactofugación en la Calidad del Queso Gouda Utilizando Leches con Diferentes Recuentos Bacterianos*, Universidad Austral de Chile, Chile
49. Perea, J., Santana, T., & De Hombre, R. (2014) *Influencia de factores tecnológicos en la consistencia de leches fermentadas batidas*, Cuba
50. Pereda, J., (2009), *Utilización de la ultra alta presión por homogenización como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche en consumo*. Universidad Autónoma de Barcelona.
51. Pérez, B. S. (2011). Nuevos alimentos y nuevas tecnologías emergentes de la industria alimentaria. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia
52. Raso, J., Pagán, R., & Condón, S. (2015), *Combination of nonthermal technologies with other preservation factors*. España
53. Ribeiro J.C.,Tamanini R.,Alfieri A.A., V. Beloti, (2020), *Effect of milk bactofugation on the counts and diversity of thermotolerant bacteria*, *Journal of Dairy Science*, ELSEVIER
54. Rodríguez-Salinas, Pablo Alan, Urías-Orona, Vania, Muy-Rangel, Dolores, Basilio-Heredia, José, Suarez-Jacobo, Angela, Báez-González, Juan Gabriel, Zavala-García, Francisco, & Niño-Medina, Guillermo. (2021). Efecto de termosonicación y pasteurización sobre propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y nutracéuticas en bebidas de maíz

55. Ros Berruezo Gaspar, (2015) *Nuevos métodos tecnológicos de conservación no térmicos*, Academia de Ciencias Veterinarias Academia de Ciencias Veterinarias de Andaluc de Andalucía Oriental a Oriental, España
56. Saavedra Guerra, Jesús Andrés, (2019), *Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano del plasma frío atmosférico sobre especies patogénicas de interés alimentario*, Universidad de Talca. Escuela de Tecnología Médica, Chile
57. Sánchez-Moreno, Concepción, González-Peña, Diana, Colina-Coca, Clara, & Ancos, Begoña de. (2018). Métodos físicos no tradicionales de control microbiológico aplicables al proceso de elaboración de hortalizas de IV Gama. *Agrociencia (Uruguay)*, 22(1), 26-36. <https://dx.doi.org/10.31285/agro.22.1.3>
58. Sarmiento, A. (2007). *Evaluación de Nisina como bioconservante en leche fluida* (Bachelor's thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
59. Secretaría de economía, (2012), *Análisis del sector lácteo en México*, México.
60. Shafiur Rahman Mohammad; Velez-Ruiz Jorge F, (2013), *Handbook of Food Preservation, Second Edition*,
61. SIAP, (2016), *Atlas agroalimentario 2016*, SAGARPA, México.
62. SIAP, (2017), *Atlas agroalimentario 2017*, SAGARPA, México.
63. SIAP, (2018), *Atlas agroalimentario 2018*, SAGARPA, México.
64. SIAP, (2019), *Atlas agroalimentario 2019*, SAGARPA, México.
65. SIAP, (2020), *Atlas agroalimentario 2020*, SAGARPA, México.
66. Silva Angulo, Á. B., (2009), *Efecto del polvo de cacao y los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF) en la inactivación de células vegetativas de bacillus cereus en una bebida mezcla de huevo líquido y leche* (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
67. Soleno, R. (2015). Tecnologías no térmicas en el procesado y conservación de alimentos vegetales. Una revisión. *Revista colombiana de investigaciones agroindustriales*, 2, 73-83.
68. Spreer Edgar, (1991), *Lactología industrial, leche, preparación y elaboración. Máquinas, instalaciones y aparatos. Productos lácteos*, 2° edición, Editorial Acribia, España.
69. Tellez L., S. T., Ramírez, J. A., Lamela, C. P., Vázquez, M., & Gándara, J. S. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*.
70. Trujillo AJ, Roig-Sagués AX, Zamora A, Ferragut V. 2016. High-pressure homogenization for structure modification. In: Knoerzer K, Juliano P, Smithers G. (eds). *Innovative food proces-sing technologies*. UK: Woodhead Publishing

71. Vargas Sánchez, R. D., Torrescano Urrutia, G. R., & Sánchez Escalante, A. (2013). *El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria*. *Interciencia*, 38(10).
72. Vásquez Mazo, (2015). *Efecto de la combinación de luz ultravioleta y temperatura en el procesamiento de leche y derivados*.
73. Velasco Bermúdez María Fernanda, (2017), *Desnaturalización de proteínas séricas de leche bovina por termosonicación y su aplicación en queso fresco*, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
74. Vignoli, R. (2008). Esterilización, desinfección y antisepsia. *Extraído el*, 5.
75. Villegas de Gante Abraham, Santos Moreno Armando, (2010), *Calidad de leche cruda*, México, Trillas.
76. Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., Van Boekel, M. A. J. S., (1999), *Dairy technology, Principles of milk. Properties and processes*, Marcel Dekker, EUA.
77. Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P., & Versteeg, C, (2009), *Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety—pulsed electric field and low-temperature plasma*. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 414-424.
78. Zamora A, Ferragut V, Jaramillo PD, Guamis B, Trujillo AJ. (2012). *Ultrahigh pressure homogenisation of milk: technological aspects of cheese-making and microbial shelf life of a starter-free fresh cheese*. *J Dairy Sci* 79: 168-175. doi: 10.1017/S0022029912000052
79. Zavala, A. E. A. (2018). Evaluación del tratamiento de altas presiones hidrostáticas en leche de vaca como método equivalente a la pasteurización, Universidad Autónoma de Querétaro, México