

Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia d'Aliments

**Efecto de la Aplicación de Pulsos Eléctricos
de Alta Intensidad de Campo sobre
Enzimas y Vitaminas en Leche**

Silvia Bendicho Porta

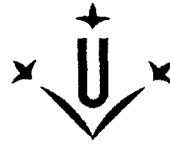
Tesis Doctoral

Mayo 2002

**(043)"2002"
BEN**

(043) "2002" BEN

1622221471 X



Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia d'Aliments

 Universitat de Lleida
Registre General

10 MAIG 2002

2148

3:

Efecto de la Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad de Campo sobre Enzimas y Vitaminas en Leche

Memoria presentada por:

Silvia Bendicho Porta

para optar al grado de Doctora

Directora: Olga Martín Belloso

Lleida, mayo de 2002

2206-81360

0180-53760

Este trabajo se ha realizado en la planta piloto y en el laboratorio de Nuevas Tecnologías del Departamento de Tecnología de la Universidad de Lleida, y en la planta piloto y en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos del Departamento de Ingeniería de Sistemas Biológicos de la Universidad Estatal de Washington (WA, USA). Para su realización, se ha contado con ayuda económica del MEC y la CICYT.

RESUMEN

En la actualidad, el método más usado para la pasteurización de alimentos es la aplicación de calor, aunque en estas últimas décadas están surgiendo tecnologías alternativas entre las que cabe destacar el uso de los pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC).

Se ha visto que con esta técnica se pueden conseguir altos niveles de inactivación microbiana en leche, aunque al igual que en otros productos, hay pocos estudios acerca del efecto que produce en enzimas y componentes minoritarios. En este trabajo, se ha estudiado el efecto de los PEAIC en una lipasa y una proteasa producidas por dos bacterias psicrótrofas, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*, respectivamente, suspendidas en leche o solución modelo de ultrafiltrado de leche (SMUL). Además, se ha estudiado el efecto de los PEAIC en diversas vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles; para así, evaluar la efectividad de esta técnica en la inactivación de enzimas y el grado de alteración que provoca en el valor nutricional de la leche.

En primer lugar, se eligieron y validaron los métodos que iban a ser usados para la cuantificación de las actividades de ambas enzimas y el contenido en vitaminas, observándose que en todos los casos, los métodos resultaron fiables para el uso previsto.

La leche o la SMUL conteniendo la lipasa o proteasa se procesó mediante PEAIC o calor, observándose que mediante PEAIC se pudo reducir en un elevado porcentaje la actividad de estos enzimas termoresistentes, aunque la efectividad del tratamiento dependió de las características del medio, las condiciones de procesado y de las características del equipo de tratamiento.

La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* suspendida en SMUL resultó resistente a los tratamientos térmicos de pasteurización, mientras que cuando se sometió a tratamientos mediante PEAIC por tandas o en flujo continuo, la actividad disminuyó con el aumento de la intensidad de campo (16.4-37.3 kV/cm) y el número de pulsos (hasta 80 pulsos). El tratamiento por tandas fue mucho más efectivo que el continuo, ya que aplicando densidades de energía similares (504.97 y 424.36 kJ/l) la actividad se redujo un 62.1% y un 13%, respectivamente.

La proteasa de *Bacillus subtilis* resultó mucho más resistente a los tratamientos mediante PEAIC que la lipasa estudiada, tanto en SMUL como en leche desnatada, ya que después de aplicar hasta 500 kJ/l en equipos diferentes se observó poca efectividad en la inactivación de la proteasa tanto en tratamiento por tandas como en flujo continuo. Para conseguir una inactivación considerable del enzima se requirieron tratamientos de densidades de energía superiores a 6000 kJ/l. La actividad del enzima suspendido en SMUL o en leche (desnatada y entera) se redujo al aumentar la duración del tratamiento (hasta 895.8 μ s), la intensidad de campo (19.7-35.5 kV/cm), la densidad de energía (hasta 6786.8 kJ/l) y la frecuencia (66.66-111.11 Hz). El medio en que los tratamientos resultaron más efectivos fue la leche desnatada, consiguiéndose una inactivación del 81.1% después de un tratamiento de 6559.8 kJ/l a 111.11 Hz. Al pasteurizar las muestras térmicamente, se observó un comportamiento similar, ya que en condiciones de pasteurización alta (75°C-15 s) el enzima resultó mucho más sensible en leche desnatada que en SMUL.

En ambos casos, la reducción de la actividad enzimática se pudo relacionar mediante diversos modelos matemáticos respecto a la densidad de energía, tiempo de tratamiento y/o intensidad de campo.

El efecto de los PEAIC en las vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, colecalfiferol y tocoferol) en leche y SMUL, se estudió aplicando tratamientos de hasta 400 μ s a intensidades de campo de 18.3 a 27.1 kV/cm. El efecto también se comparó con el resultante de aplicar diversos tratamientos térmicos. A excepción del ácido ascórbico, en ningún caso se produjeron pérdidas significativas del contenido en vitaminas. La leche retuvo mayor cantidad de ácido ascórbico después de un tratamiento de 400 μ s a 22.6 kV/cm (93.4%) que después de aplicar procesos térmicos de pasteurización baja (49.7%) o alta (86.7%). La disminución del contenido en ácido ascórbico siguió una tendencia de tipo exponencial en ambos tipos de tratamiento (PEAIC y calor). También se observó que la retención de vitamina después de aplicar el tratamiento mediante PEAIC fue mayor en leche que en SMUL, demostrándose un efecto protector de los componentes naturales de la leche.

En este trabajo se ha probado que los PEAIC pueden ser una buena alternativa al tratamiento térmico para la conservación de leche; ya que con esta técnica se pueden conseguir niveles altos de inactivación de enzimas indeseables sin causar grandes alteraciones en el contenido en vitaminas.

RESUM

En l'actualitat, el mètode més utilitzat per a la pasteurització d'aliments es l'aplicació de calor, encara que en aquestes darreres dècades estan sorgint tecnologies alternatives, entre les quals cal destacar l'ús dels polsos elèctrics d'alta intensitat de camp (PEAIC).

En llet, s'ha vist que amb l'aplicació d'aquesta tècnica es poden aconseguir alts nivells d'inactivació microbiana, encara que igual que en altres productes, hi ha pocs estudis sobre l'efecte que produeixen en enzims i components minoritaris. En aquest treball, s'ha estudiat l'efecte dels PEAIC en una lipasa i una proteasa produïdes per dos bacteris psicròtrofs, *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus subtilis*, respectivament, en llet o solució model d'ultrafiltrat de llet (SMUL). A més, s'ha estudiat l'efecte dels PEAIC en diverses vitamines tant hidrosolubles com liposolubles; per així, avaluar l'efectivitat d'aquesta tècnica en la inactivació d'enzims i el grau d'alteració que provoca en el valor nutricional de la llet.

En primer lloc, es van elegir i validar els mètodes que s'utilitzarien per quantificar les activitats d'ambdòs enzims i el contingut en vitamines, observant-se que en tots els casos, els mètodes van resultar fiables pel seu ús previst.

La llet o la SMUL amb la lipasa o proteasa es van processar mitjançant PEAIC o calor, observant-se que amb PEAIC es va poder reduir en un elevat percentatge l'activitat d'aquests enzims termoresistents, encara que l'efectivitat del tractament depèn de les característiques del medi, les condicions de processat i de les característiques de l'equip de tractament.

La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* suspesa en SMUL va resultar resistent als tractaments tèrmics de pasteurització, mentre que quan es va sotmetre a un tractament mitjançant PEAIC per tandes o en fluxe continu, l'activitat va disminuir amb l'augment de la intensitat de camp (16.4-37.3 kV/cm) i el nombre de polsos (fins a 80 polsos). El tractament per tandes va ser molt més efectiu que el continu, ja que aplicant densitats d'energia similars (504.97 y 424.36 kJ/l) l'activitat es va reduir un 62.1% i un 13%, respectivament.

La proteasa de *Bacillus subtilis* va resultar molt més resistent que la lipasa estudiada als tractaments mitjançant PEAIC, tant en SMUL com en llet desnatada, ja que després d'aplicar fins a 500 kJ/l en tres equips diferents es va observar poca efectivitat en la inactivació de la proteasa tant en el procés en tandes com en el continu. Per aconseguir una inactivació considerable de l'enzim es van requerir tractaments de densitats d'energia superiors a 6000 kJ/l. L'activitat de l'enzim suspès en SMUL o en llet (desnatada i sencera) es va reduir amb l'increment de la duració del tractament (fins a 895.8 μ s), la intensitat de camp (19.7-35.5 kV/cm), la densitat d'energia (fins a 6786.8 kJ/l) i la freqüència (66.66-111.11 Hz). El medi en que els tractaments van resultar més efectius va ser la llet desnatada, on es va aconseguir una inactivació del 81.1% després d'un tractament de 6559.8 kJ/l a 111.11 Hz. Al pasteuritzar les mostres tèrmicament es va observar un comportament similar, ja que en condicions de pasteurització alta (75°C-15 s) l'enzim va resultar molt més sensible en llet desnatada que en SMUL.

En ambdòs casos, la reducció de l'activitat enzimàtica es va poder relacionar mitjançant diversos models matemàtics respecte a la densitat d'energia, temps de tractament i/o intensitat de camp.

L'efecte dels PEAIC en les vitamines (tiamina, riboflavina, àcid ascòrbic, colecalciferol i tocoferol) en llet i SMUL, es va estudiar aplicant tractaments de fins a 400 μ s a intensitats de camp de 18.3 a 27.1 kV/cm. L'efecte també es va comparar amb el resultant d'aplicar diversos tractaments tèrmics. A excepció de l'àcid ascòrbic, en cap cas es va produir pèrdues significatives del contingut en vitamines. La llet va retenir major quantitat d'àcid ascòrbic després d'un tractament de 400 μ s a 22.6 kV/cm (93.4%) que després d'aplicar processos tèrmics de pasteurització baixa (49.7%) o alta (86.7%). La disminució del contingut en àcid ascòrbic va seguir una tendència de tipus exponencial en ambdòs tipus de tractament (PEAIC i calor). També es va observar que la retenció de vitamina després d'aplicar el tractament mitjançant PEAIC va ser més alta en llet que en SMUL, demostrant-se un efecte protector dels components naturals de la llet.

En aquest treball s'ha provat que els PEAIC poden ser una bona alternativa al tractament tèrmic per la conservació de llet; ja que amb aquesta tècnica es poden aconseguir nivells alts d'inactivació d'enzims indesitjables sense causar grans alteracions en el contingut en vitamines.

SUMMARY

Nowadays, the most used method for food pasteurization is the application of heat. Nevertheless, in the last decades, several alternative technologies are emerging and one of the most promising is high intensity pulsed electric fields (HIPEF).

In milk, high levels of microbial destruction can be achieved using this technology. However, as for other products, few studies exist about the effect of HIPEF on enzymes and other minor food components. In this work, the effect of HIPEF on a lipase and a protease produced by the psychrophilic bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*, suspended in milk or simulated milk ultrafiltrate (SMUF) has been studied. The effect of HIPEF on several hydro or liposoluble vitamins has also been studied in order to know the effectiveness of this technology in inactivating undesirable enzymes and the changes that cause on the nutritional value of milk.

First of all, the methods required for the quantification of enzyme activities and vitamin content were chosen and validated. It was observed that in all the cases, the methods resulted reliable for their use.

Milk or SMUF samples containing lipase or protease were processed by HIPEF or heat. HIPEF could reduce quite a lot the activity of these thermoresistant enzymes, although treatments effectiveness depended on the medium characteristics, process conditions and equipment configuration.

Lipase from *Pseudomonas fluorescens* suspended in SMUF resulted resistant to thermal pasteurization, whereas when subjected to a batch or a continuous mode HIPEF treatment, its activity decreased with the increase of the field strength (16.4-37.3 kV/cm) and the number of pulses (up to 80 pulses). The batch mode treatment was much more effective than that on continuous mode, since after applying similar energy densities (504.97 and 424.36 kJ/l) the activity was reduced a 62.1% and a 13%, respectively.

Protease from *Bacillus subtilis* resulted much more resistant than the evaluated lipase to HIPEF processes whatever was the treatment medium (SMUL, skim milk). After HIPEF treatments of up to 500 kJ/l using different equipments (batch or continuous), low effectiveness on protease inactivation was observed. To achieve a notable level of enzyme inactivation, treatments of energy densities higher than 6000 kJ/l were required.

Protease activity suspended in SMUF or milk (skim or whole milk) subjected to HIPEF decreased with the increase of the treatment duration (up to 895.8 μ s), field strength (19.7-35.5 kV/cm), energy density (up to 6786.8 kJ/l) and the pulse repetition rate (66.66-111.11 Hz).

Treatments resulted more effective in skim milk than in SMUF and whole milk, since up to a 81.1% inactivation was achieved after a HIPEF treatment of 6559.8 kJ/l at 111.11 Hz. When samples were processed thermally, a similar behavior was observed, since the enzyme resulted more sensitive in skim milk than in SMUF after a pasteurization process (75°C-15 s).

In both cases, the reduction of enzyme activity could be fitted to several mathematical models related to the energy density, treatment time and/or field strength.

The effect of HIPEF on vitamins (thiamin, riboflavin, ascorbic acid, cholecalciferol and tocopherol) in milk and SMUF, was studied by applying treatments of up to 400 μ s at field strengths from 18.3 to 27.1 kV/cm. The effect of HIPEF on vitamins was also compared to that of thermal pasteurization. Only ascorbic acid showed changes on its content after HIPEF or thermal treatments. Milk retained higher levels of ascorbic acid after a HIPEF treatment of 400 μ s at 22.6 kV/cm (93.4%) than after thermal pasteurization processes of 63°C-30 min (49.7%) or 75°C-15 s (86.7%). Ascorbic acid content reduction followed an exponential model in both cases (HIPEF and heat). It was also observed that vitamin retention after a HIPEF treatment was higher in milk than in SMUF, demonstrating a protective effect of milk components.

In this work, it has been proved that HIPEF might be a good alternative to thermal process for food preservation. Using this technology, high levels of enzyme inactivation can be achieved without causing important changes in the vitamin content.

ÍNDICE

- **INTRODUCCIÓN**

- I. La leche: Composición, microorganismos y enzimas alteradores y procesado térmico.....1
- II. Pulsos eléctricos de alta intensidad de campo. Tecnología del proceso.....23
- III. Procesado de leche mediante pulsos eléctricos de alta intensidad de campo.....36
- IV. Validación de métodos analíticos.....53

- **OBJETIVOS.....62**

- **PUBLICACIONES**

- 1. Validation and comparison of analytical methods based on the release of p-nitrophenol to determine lipase activity in milk.....63
- 2. Determination of proteolytic activity in different milk systems.....77
- 3. Effects of high intensity pulsed electric field and thermal treatments on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*.....87
- 4. Inactivation kinetics of a lipase from *Pseudomonas fluorescens* exposed to high intensity pulsed electric fields.....106
- 5. High intensity pulsed electric fields and heat treatments on a protease from *Bacillus subtilis*. A comparison study with multiple systems.....119
- 6. Reduction of protease activity in simulated milk by continuous flow high intensity pulsed electric field treatment.....136

7. Reduction of protease activity in milk by continuous flow high intensity pulsed electric field treatments.....	152
8. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk.....	165
• DISCUSIÓN GENERAL.....	179
• CONCLUSIONES.....	192

INTRODUCCIÓN

LA LECHE:

- **Composición**
- **Microorganismos y enzimas alteradores**
- **Procesado térmico**

CONSIDERACIONES GENERALES.

Según el capítulo 15 del Código Alimentario Español de 1982, la leche natural es "*el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas, domésticas, sanas y bien alimentadas*". Aunque la leche puede tener orígenes muy diferentes, siempre debe tener unas características físicas más o menos constantes (Tabla 1) (Luquet, 1991).

La leche se puede considerar un líquido alimentario, blanco y opaco; aunque, en algunos casos, puede presentar una tonalidad ligeramente amarillenta. Debe tener un sabor característico, puro, suave, fresco y ligeramente dulzón, así como un olor igualmente característico y puro (Spreer, 1991). Los métodos modernos de obtención y refrigeración de la leche en la granja han contribuido, de forma muy importante, a la conservación del gusto característico de la leche (Amiot, 1991). La consistencia de la leche (*coherencia entre sus partículas*) es homogénea y debe carecer de grumos y copos (Spreer, 1991).

Tabla 1. Características físicas de la leche (Luquet, 1991).

Parámetro	Valores
pH	6.5 - 6.7
Acidez valorable	15 - 18 Dornic
Densidad	1.028 - 1.036 g/ml
Temperatura de congelación	0.51 a -0.55 °C
Índice de refracción	1.3440 - 1.3485
Tensión superficial	50 dinas·cm ⁻¹ a 20 °C
Potencial redox	10 - 20 V
Conductividad eléctrica	4 - 5,5 mS/cm a 25 °C, (Spreer, 1991).
Viscosidad	1,79 - 2,13 mPa·s a 20 °C (Spreer, 1991)

COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche es un fluido biológico complejo, cuya composición y propiedades físicas varían de una especie a otra en función de las necesidades dietéticas de las crías (Varnam, 1995), así como también existe un amplio margen de variación dentro de la especie, e incluso entre individuos de una raza de la misma especie (Porter, 1980).

De todos es sabido que la leche ofrece unos constituyentes integrados por agua en su fracción líquida y en la que se hallan en suspensión o disolución tanto componentes nutritivos energéticos (*grasas e hidratos de carbono*) como elementos nutritivos plásticos (*proteínas y minerales*). Entre los biocatalizadores figuran pigmentos, enzimas y vitaminas. De hecho, la leche contiene cantidades adecuadas de casi todas las vitaminas necesarias para el funcionamiento correcto de los procesos bioquímicos que se producen en el organismo humano y que son esenciales para la vida. Es, sin duda, el mejor alimento

natural porque cuenta con cantidades relativamente importantes de unos 55 nutrientes esenciales para el hombre. Asimismo, se hallan en disolución gases como oxígeno, nitrógeno y anhídrido carbónico (Santo Domingo, 1993). Sin embargo, no es un alimento completo; la leche, con independencia de su origen, es deficitaria en vitamina D y en hierro (Porter, 1980).

En la Tabla 2 se refleja la composición general de la leche de vaca según Alais (1985). Los datos cuantitativos que se recogen son sólo aproximados, ya que varían en función de múltiples factores. De hecho, debe quedar claro que la composición exacta de una muestra de leche únicamente se puede conocer mediante su análisis químico pormenorizado (Amiot, 1991).

Tabla 2. Composición típica de la leche de vaca (Alais, 1985).

	Composición (g/l)	Estado físico de los componentes
· Agua	905	Agua libre (disolvente + agua ligada (3,7%))
· Glúcidos: lactosa	49	Solución
· Lípidos	35	
Materia grasa propiamente dicha.	34	Emulsión de los glóbulos grasos (3 a 5 micras)
Lecitina (fosfolípidos)	0,5	
Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles)	0,5	
· Prótidos	34	Suspensión micelar de fosfocaseinato de cal
Caseína	27	(0,08 a 0,12 micras)
Prótidos "solubles" (globulinas, albúminas)	5,5	Solución (coloidal)
Sustancias nitrogenadas no proteicas.....	1,5	Solución (verdadera)
· Sales	9	Solución o estado coloidal (P y Ca)
Del ácido cítrico (en ácido)	2	(Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.)
Del ácido fosfórico (P ₂ O ₅)	2,6	
Del ácido clorhídrico (NaCl)	1,7	
· Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos)	indicios	
· Extracto seco (total).....	127	
· Extracto seco desengrasado	92	

La leche puede considerarse como un sistema coloidal constituido por una solución acuosa de lactosa (5%), sales (0,7%) y muchos otros elementos en disolución, donde se encuentran suspendidas las proteínas (3,2%) y la materia grasa en emulsión. El extracto seco total de la leche es por término medio del 13,1 % y el extracto seco desengrasado del 9,2 % (Amiot, 1991).

La característica esencial de la leche es el equilibrio en que se encuentran sus componentes, lo que le proporciona un inestimable valor nutritivo y buena digestibilidad. Por ello, su presencia es necesaria en dietas de personas de edades y de situaciones críticas como la infancia o, en el otro extremo, la ancianidad; situaciones de patologías de diferente etiología y también en situaciones fisiológicas especiales, como la gestación o la lactación. Así pues, no cabe la menor duda de que las cualidades nutricionales de la leche son excelentes, lo cual la convierte en un alimento de importancia básica (Santo Domingo, 1993).

Lípidos

De todos los componentes de la leche, la fracción que más varía es la formada por las grasas, estando en una proporción que oscila entre el 3,2 y el 6%. Entre los diversos factores que influyen sobre el “porcentaje graso” se encuentran la diferente alimentación, el alojamiento, el estado sanitario y las características individuales de las vacas lecheras (Spreer, 1991).

La composición de la grasa de la leche es compleja. Aunque está dominada por triglicéridos (98% de la grasa de la leche), pequeñas cantidades de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres, también contiene otras clases de lípidos; entre los que se incluyen fosfolípidos, cerebrósidos y esteroides (colesterol y ésteres de colesterol). También se encuentran pequeñas cantidades de vitaminas liposolubles (principalmente, A, D y E) y componentes del flavor (lactonas, aldehídos y cetonas).

Las proporciones de los diferentes ácidos grasos, de los distintos tipos de fosfolípidos y de las diversas sustancias insaponificables no son fijas y de ello resultan las variaciones que pueden presentar las propiedades de la materia grasa de la leche (Alais, 1985).

Proteínas

Las proteínas constituyen alrededor del 33% del nitrógeno de la leche, lo que supone unos 32 g de proteína/kg de leche. De ellas, el 76-86% está constituido por las caseínas que se encuentran en la leche en forma micelar correspondiendo el resto a las seroproteínas y a un grupo de enzimas y proteínas minoritarias (Calvo, 1989).

Bajo la denominación genérica de caseínas se agrupan una serie de proteínas que precipitan a pH 4.6 y presentan por lo menos un enlace éster-fosfato en su molécula. Se agrupan 4 tipos de cadenas polipeptídicas denominadas α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseína, y una serie de derivados formados por la forforilación, transglicosilación, o la simple proteólisis (Veisseyre, 1988).

Las seroproteínas o proteínas del suero son las proteínas que permanecen en el suero después de llevar el pH de la leche a 4.6. Todas ellas poseen en común una estructura globular y son térmicamente inestables (Veisseyre, 1988). Están la β -lactoglobulina (β -lg), α -lactoalbúmina (α -1a), inmunoglobulinas y seroalbúmina (SA), en orden de concentración decreciente (Veisseyre, 1988).

También existen otras proteínas minoritarias entre las que se incluyen proteínas como lactoferrina y transferrina, microglobulina β_2 , glicoproteínas ácidas, etc (Amiot, 1991).

Carbohidratos

Los carbohidratos de la leche están constituidos casi exclusivamente por lactosa, esta se encuentra en una concentración de 45-50 g/l en el suero lácteo. En el suero también se encuentran otros azúcares en menor proporción como: monosacáridos, principalmente glucosa y galactosa; oligosacáridos neutros que contienen glucosa y lactosa y pueden encontrarse libres o combinados; oligosacáridos ácidos; fosfatos de azúcares como pentosa fosfato, glucosa 1-fosfato, etc.; N-glucósicos, se cree que son intermediarios de la síntesis de glicoproteínas (Veisseyre, 1988).

Además de los azúcares presentes en el suero, existen glúcidos unidos a lípidos o proteínas en las unidades estructurales de la leche (micelas de caseína y glóbulos grasos).

Vitaminas

Las vitaminas pueden definirse como *compuestos orgánicos que el organismo necesita en pequeñas cantidades para los procesos metabólicos* (Talanen, 1995). Éstas no se correlacionan entre sí, ni química ni funcionalmente y cada una de ellas desempeña en el organismo su propia función y no puede ser substituida por ninguna otra substancia. Las vitaminas son acalóricas, es decir, no generan energía directamente. Además, el organismo no puede producir cantidades suficientes de vitaminas para cubrir sus necesidades y cuanto más desarrollado está el animal menos vitaminas sintetiza (Talanen, 1995).

Las funciones biológicas de las vitaminas en algunos casos no están del todo claras pero se sabe que en muchos casos éstas forman parte de algunos sistemas enzimáticos, coenzimas y catalizan reacciones químicas del metabolismo de los alimentos. También, muchas veces cooperan entre sí y con diversos minerales y ácidos grasos, lo cual quiere decir que si se toman juntas su efecto es mayor que si se toman por separado (Walstra y Jeness, 1987; Talanen, 1995).

La clasificación de las vitaminas es muy difícil puesto que tienen muy pocas características en común. Pero, se suelen clasificar en dos grandes grupos según su solubilidad: vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles (Veisseyre, 1988).

Vitaminas liposolubles

Las vitaminas que componen este grupo son: La vitamina A, D, E y K. Las fuentes más ricas son las grasas, los aceites vegetales, la verdura y los lípidos de la carne, de los derivados lácteos y de los huevos (Talanen, 1995).

Estas vitaminas son aquellas que son solubles en disolventes orgánicos o en grasas e insolubles en el agua. Entre ellas tienen pocas características en común, pero todas son compuestos orgánicos con grupos hidrófobos y constan de una estructura química básica formada por la condensación de moléculas de isopropeno, es decir, tienen característica terpénica (Badui, 1986).

En la leche, el contenido de vitamina A y de vitamina D dependen de la alimentación y de las radiaciones solares que ha tenido el ganado; las vitaminas E y K están en trazas. En general, todas ellas son estables a los tratamientos térmicos (Yufer, 1987) (Tabla 3). Todas ellas están presentes en la leche, pero desde el punto de vista nutritivo, la de mayor importancia es la vitamina A, ya que aporta aproximadamente el 13% de nuestras necesidades (Amiot, 1991).

Vitamina A. La vitamina A (retinol) es una sustancia indispensable para la visión y el buen estado de las mucosas, y tiene una acción antiinfecciosa. El retinol se forma por escisión de los carotenoides (provitamina A). Los vegetales sintetizan carotenoides pero no retinol; los animales no pueden sintetizar carotenoides pero los escinden a retinol. El contenido de la leche en vitamina A varía mucho entre la alimentación de verano (hierba rica en caroteno) y de invierno (heno y raíces, muy pobres en caroteno). El calostro contiene unas diez veces más de vitamina que la leche. La leche y particularmente la mantequilla son una de las principales fuentes de vitamina A para el hombre. Esta vitamina es estable al calor (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

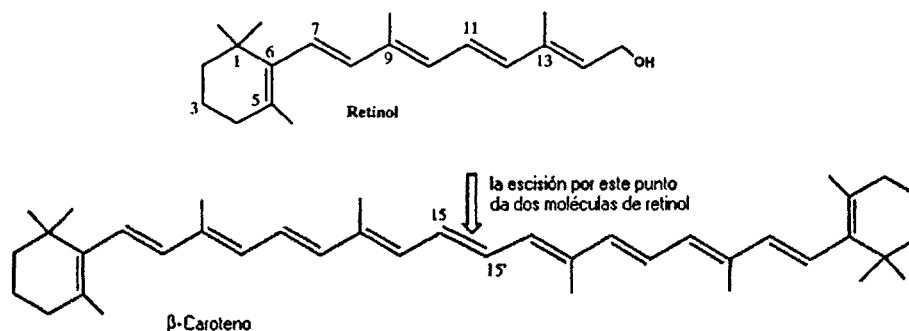


Figura 1. Estructura del retinol y del β-caroteno.

Vitamina D. La vitamina D comprende varias sustancias con actividad antirraquítica. En los vegetales hay ergocalciferol (D_2) que se forma por irradiación UV del ergosterol. El colecalciferol (D_3) se origina en los animales por irradiación UV del 7-dehidrocolesterol, especialmente de la piel (Figura 2). En la leche hay tanta D_2 como D_3 que proceden respectivamente del pienso y de la irradiación de la piel de la vaca. El contenido de vitamina D de la leche es muy variable, pero siempre bajo. La vitamina D es estable al tratamiento térmico de la leche (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

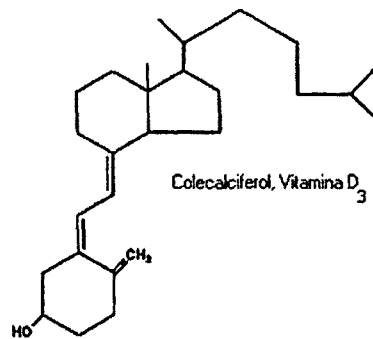


Figura 2. Estructura del colecalciferol

Vitamina E. La vitamina E está constituida por un grupo de tocoferoles; en la leche, el principal es el α -tocoferol (Figura 3). Se trata de un potente reductor que sirve de antioxidante protegiendo a los lípidos de la oxidación. El contenido de vitamina E de la leche es bajo. Depende, hasta cierto grado, del pienso; la leche de verano tiene generalmente una mayor concentración que la de invierno. Es estable al calor pero puede destruirse parcialmente iluminándola intensamente en presencia de O_2 (Alais, 1985; Fox y McSweeney, 1998).

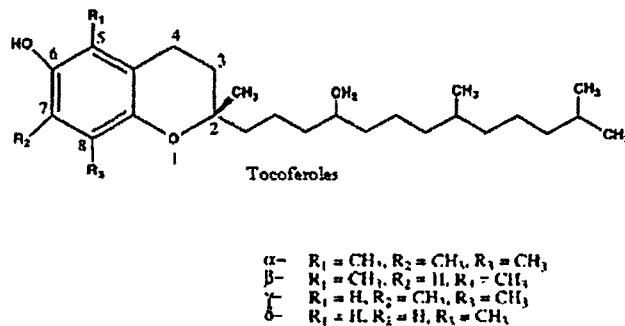


Figura 3. Estructura de los diferentes tocoferoles

Vitamina K. La vitamina K tiene función antihemorrágica, su ausencia provoca trastornos en la coagulación sanguínea debido a la insuficiencia de protrombina. En la leche, si aparece, sólo se encuentra en cantidades vestigiales. Las necesidades humanas de esta vitamina se cubren al ingerir vegetales que la contienen y por síntesis microbiana en el tracto digestivo (Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

Vitaminas hidrosolubles.

Las vitaminas que constituyen este grupo son las vitaminas del grupo B (B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico) y la vitamina C (Fox y McSweeney, 1998).

Este grupo de vitaminas son aquellas que se encuentran disueltas en la fase acuosa de los alimentos. Se deben aportar diariamente en la dieta puesto que el sistema metabólico no permite su acumulación sino que los excedentes son eliminados con la orina (Aurand et al., 1987). La mayoría de estas vitaminas actúan como coenzimas de diferentes sistemas enzimáticos en procesos metabólicos (Fox y McSweeney, 1998).

Otra característica es que debido a su alta solubilidad se eliminan con gran facilidad por lixiviación a través de tratamientos por los que el alimento pierde agua, por ejemplo, durante la descongelación de los productos, lavado, tratamientos térmicos y deshidratación (Badui, 1986) (Tabla 3).

Las vitaminas hidrosolubles presentes en la leche, en su gran mayoría, han sido sintetizadas por las bacterias del rumen y su concentración en ella varía muy poco (Primo, 1987) (Tabla 3). La riboflavina o vitamina B₂ es la más importante, ya que puede aportar hasta el 41% de nuestras necesidades diarias. La leche cubre más del 20% de nuestras necesidades en cianocobalamina (vitamina B₁₂). También contienen cantidades apreciables de otras vitaminas hidrosolubles como la vitamina B₁ o tiamina (9% de las RDA), vitamina B₆ o piridoxina (10% de las RDA) y ácido ascórbico o vitamina C (4% de las RDA) (Amiot, 1991). (RDA=Recommended Dietary Allowances).

Vitamina B₁. La vitamina B₁ (tiamina) se presenta en la leche en gran parte en estado libre, pero una porción (18-45%) está fosforilada y una pequeña proporción unida a la proteína (Figura 4). La forma biológicamente activa de la tiamina es su pirofosfato, que actúa como enzima de la carboxilasa; en la leche no se encuentra en este estado; la porción fosforilada probablemente es el pirofosfato. En los bóvidos, las bacterias del aparato digestivo pueden sintetizar esta vitamina, por tanto, el contenido de tiamina de la leche no se afecta apenas por el pienso de la vaca, ni por la estación del año, ni por la raza; aunque la proporción de tiamina es mayor al comienzo de la lactación. Los tratamientos térmicos y la exposición a la luz y al O₂ provocan una disminución del contenido en tiamina (Walstra y Jeness, 1987; Veisseyre, 1988; Fox y McSweeney, 1998)

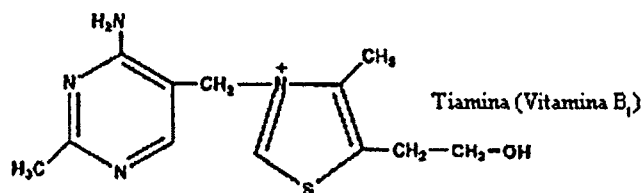


Figura 4. Estructura de la tiamina

Vitamina B₂. La vitamina B₂ (riboflavina) aparece en la leche principalmente en estado libre (65-95%) y la mayoría de la restante se encuentra formando parte del coenzima flavin-adenin-dinucleótido (FAD) y posiblemente, una porción está en forma de riboflavin-5'-fosfato (o flavin mononucleótido, FMN) que intervienen en el proceso de oxidación celular de donde procede la energía necesaria para el mantenimiento de la vida (Figura 5). El porcentaje de esta vitamina suele ser poco variable, sin embargo, se eleva un poco con la alimentación de primavera y principios de verano. Como algunas otras vitaminas hidrosolubles, la riboflavina es sintetizada por la microflora del rumen. Para el hombre, la leche constituye la fuente más importante de riboflavina. La concentración en el calostro es de dos a cuatro veces la de la leche. La riboflavina es estable al calor y a la presencia de oxígeno a pH ácido; pero en condiciones alcalinas es bastante termolábil. El factor que más afecta en la estabilidad de la riboflavina es la exposición a la luz. Es el principal componente fotolábil de la leche (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Veisseyre, 1988; Fox y McSweeney, 1998).

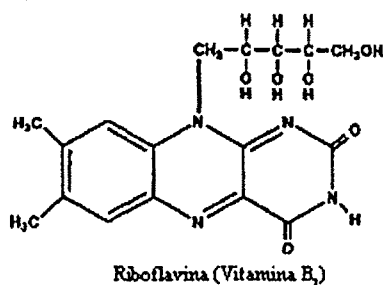


Figura 5. Estructura de la riboflavina

Vitamina B₆. La vitamina B₆ consta de tres componentes activos (piridoxina, piridoxal y piridoxamina) que constituyen una importante coenzima del metabolismo de los aminoácidos (Figura 6). En la leche, se encuentra, principalmente, en forma de piridoxal. El contenido de vitamina B₆ en leche es algo mayor cuando las vacas se encuentran en el inicio de la época de pastos y también es más alto en los periodos avanzados de lactación. Es sensible al calor y a la luz (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

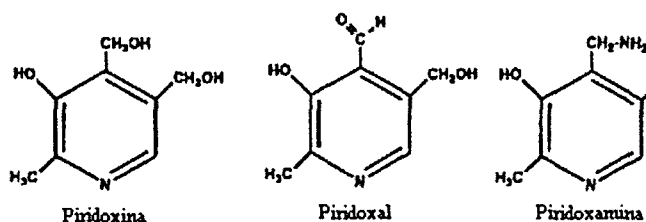


Figura 6. Formas activas de la vitamina B₆: piridoxina, piridoxal y piridoxamina.

Vitamina B₁₂. La vitamina B₁₂ (cobalamina) es la única vitamina que contiene un metal: un átomo de Co. El contenido de esta vitamina en la leche depende en gran parte de la ingestión de Co por la vaca. La única o al menos la fuente predominante de vitamina B₁₂ de la leche, es su biosíntesis por los microorganismos del rumen. La leche es una fuente relativamente importante de vitamina B₁₂. Su contenido varía mucho con la alimentación, la raza, la época estacional y el estado de lactación, salvo en el caso del calostro, donde abunda. Esta vitamina es bastante estable al calor (dependiendo del tipo de tratamiento) y totalmente a la exposición a la luz (Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

Niacina. La niacina (ácido nicotínico) y su amida, niacinamida (nicotinamida) constituyen una vitamina que en forma de nucleótidos (NAD⁺ y NADP⁺) actúa como coenzima de muchas deshidrogenasas. La vitamina se encuentra en la leche, principalmente, como niacinamida. Las diferencias en concentraciones atribuibles al pienso, raza, época estacional y fase de lactación no son grandes ni constantes. La vitamina es bastante estable a la exposición al aire, a la luz y al calor.

La leche es pobre en niacina propiamente dicha, pero es sabido que muchos animales, incluido el hombre, sintetizan niacina a partir del triptófano; y la leche, por su contenido en triptófano, es una buena fuente de equivalentes de niacina (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Veisseyre, 1988; Fox y McSweeney, 1998).

Ácido pantoténico. El ácido pantoténico es el constituyente esencial del coenzima A, que estimula la síntesis de acetilcolina, de colina y de diversos aminoácidos. Toma parte también en la síntesis de los ácidos grasos y en el metabolismo de los glúcidos. La flora intestinal humana puede sintetizar una parte de las necesidades. La leche constituye, sin embargo, una fuente muy interesante de ácido pantoténico. Su contenido en la leche depende de la alimentación, la raza, de la época estacional y del estado o fase de lactación. Es estable al calor y a la luz (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Veisseyre, 1988).

Biotina. La biotina (o vitamina H) es sintetizada por los microorganismos del rumen y del intestino de la vaca. La concentración de biotina de la leche es relativamente constante. La biotina es estable durante el procesado y almacenamiento de la leche (Walstra y Jeness, 1987; Veisseyre, 1988; Fox y McSweeney, 1998).

Ácido fólico. El ácido fólico se encuentra en la leche principalmente como 5-metiltetrahidrofolato. LA leche contiene una proteína específica que liga específica y fuertemente el folato aumentando su biodisponibilidad. Esta vitamina es relativamente

inestable, ya que se pierde por calentamiento, exposición al O_2 o a la luz. La protege el ascorbato, que también es muy sensible (Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

Vitamina C. La vitamina C (ácido L-ascórbico) tiene poco interés como vitamina en la leche de vaca, debido a su baja concentración en comparación con las necesidades humanas y a su labilidad frente al calor y la oxidación. El ácido L-ascórbico de la leche procede de los alimentos y de la biosíntesis hepática; es importante en los fenómenos de oxidación-reducción. La oxidación del ascorbato a dehidroascorbato es reversible, por lo tanto la potencia vitamínica C de la leche es la suma de ambos. Al segregarse la leche solamente presenta ácido L-ascórbico pero la oxidación origina pronto dehidro-L-ascorbato (Figura 7); la luz, mediante su influencia en la riboflavina, favorece la oxidación. También es sensible a los tratamientos térmicos y a la presencia de O_2 (Alais, 1985; Walstra y Jeness, 1987; Fox y McSweeney, 1998).

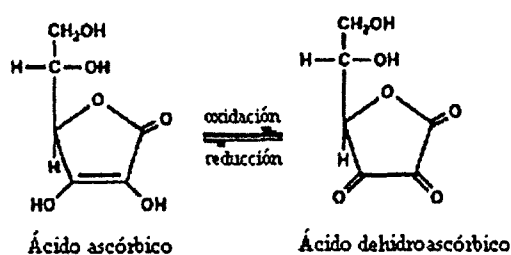


Figura 7. Reacción reversible de oxidación de la vitamina C

Tabla 3. Contenido medio en vitaminas de la leche fresca de vaca y necesidades diarias de un hombre de 20-39 años (Yufera, 1987; Mataix, 1996).

Vitaminas	Contenido (mg/100 ml)	Necesidades (mg)
Vitamina A (UI/100 ml)*	159	1.8
Vitamina D (UI/100 ml)*	2.21	0.05
Vitamina E	0.100	12
Vitamina K	0.00467	---
Tiamina	0.04	1.2
Riboflavina	0.17	1.8
Vitamina B ₆	0.06	1.8
Vitamina B ₁₂	0.0042	0.002
Niacina	0.09	20
Acido pantoténico	0.34	---
Biotina	0.003	---
Acido fólico	0.0059	0.2
Vitamina C	2.09	60

*UI: unidad internacional (0.3 µg de retinol; 0.025 µg de vitamina D)

MICROORGANISMOS ALTERADORES DE LA LECHE

Aunque teóricamente la leche al salir del pezón debería ser estéril, siempre contiene de 100 a 10 000 bacterias por ml. La población media se sitúa alrededor de 1.000 ml^{-1} , pero los datos son muy variables (Amiot, 1991). Las tasas y tipos de microorganismos presentes en la leche cruda reflejan la contaminación y proliferación microbiana ocurrida durante su ordeño, almacenamiento y transporte. El recuento total máximo tolerado en leches de cuarta categoría es de 10^6 ml^{-1} (M^o Agricultura, Pesca y Alimentación, 1985).

La incidencia de los principales grupos microbianos en leche cruda varía dependiendo de las fuentes de contaminación existentes, de la estación del año y de los métodos de limpieza y desinfección de los equipos empleados en las granjas. En leche cruda de buena calidad microbiológica, es frecuente que los micrococcos y estreptococos sean los dos grupos microbianos más abundantes de la flora inicial (Cousins y Bramley, 1987).

La leche cruda puede ser un vehículo importante de transmisión de microorganismos patógenos al hombre, entre ellos destacan *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Coxiella burnetti*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Todos ellos se destruyen durante la pasteurización, aunque el género *Bacillus* y *Clostridium* pueden llegar a soportar dicho tratamiento debido a la capacidad que tienen de formar esporas (Cousins y Bramley, 1987).

El empleo generalizado de la refrigeración para preservar la calidad inicial del producto crudo hasta el momento de su tratamiento, a temperaturas entre 4 y 7°C, ha hecho que la duración de su vida útil y la de los productos lácteos procesados esté, hoy por hoy, estrechamente ligada a la presencia y acción de las bacterias psicrótrofas (Bishop y White, 1986).

Flora psicrótrofa

Cuando la leche cruda se obtiene higiénicamente, el número de bacterias psicrótrofas no suele representar más del 10 % del total de la microflora inicial (Suhren, 1989), por lo que su presencia en la leche, por tanto, resulta normalmente de una contaminación exógena. Dada la gran ubicuidad de los microorganismos psicrótrofos, las fuentes de contaminación son numerosas y variadas: a partir del aire, cuando el ordeño se realiza a mano, y cuando la mama y el pezón no son bien lavados tras el ordeño, a través de la instalación de ordeño, de un mal diseño de las tuberías, de un estado defectuoso de las ordeñadoras, a través del material de lechería insuficientemente desinfectado o en mal estado, equipo de recogida, etc (Veisseyre, 1988). Así, en condiciones deficientes de producción se estima que su proporción puede llegar a superar el 75 % (Thomas y Thomas, 1973). La cantidad de enzimas bacterianas presentes en la leche está determinada por el tiempo y condiciones de conservación que ha sufrido (Law, 1979).

La mayor parte de las bacterias psicrótrofas son Gram-negativas y los géneros más frecuentemente identificados son *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Chromobacterium* y *Flavobacterium* (Thomas y Thomas, 1973).

Como consecuencia de un prolongado mantenimiento en frío, a pesar de que la leche tenga una buena calidad bacteriológica, igual que en el caso de que la leche cuente con una contaminación inicial elevada, se produce una preponderancia del género *Pseudomonas*. (Cousin, 1982; Griffiths et al., 1989; Griffiths y Phillips, 1984; Walker y Gingold, 1988; Cousins y Bramley, 1987). *Pseudomonas* es el género más abundante, llegando a constituir más del 50 % de todos los organismos Gram-negativos presentes (Stadhouders, 1975; Suhren, 1989). Dentro del género *Pseudomonas*, la especie *P. fluorescens* es la predominante en leche, aunque también abundan *P. putida*, *P. fragi* y *P. aeruginosa* (Cousins y Bramley, 1987; Suhren, 1989). También, aunque en menor proporción, se encuentran bacterias psicrotrofas Gram-positivas de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (*Lactococcus*) (Cousin, 1982).

La mayoría de bacterias psicrotrofas presentes en la leche producen lipasas y/o proteasas que pueden causar determinadas alteraciones organolépticas, que se observan en el producto final, incluso después de morir los organismos responsables al someter la leche a pasteurización (Visser, 1981; Cousin, 1982; Janzen et al., 1982; McKellar y Cholette, 1984; Varnam y Sutherland, 1995). Además, estos microorganismos pueden proceder de una contaminación posterior, multiplicándose durante la elaboración y el almacenamiento del producto (Bishop y White, 1986).

Lipasas y proteasas producidas por microorganismos psicrotrofos

Muchas de las especies bacterianas presentes en la leche, entre ellas *Pseudomonas fluorescens*, producen lipasas del tipo glicerol éster hidrolasa (EC 3.1.1.3). Estas lipasas hidrolizan los ésteres de glicerol preferentemente con cadenas largas de ácidos grasos (Figura 8) y actúan en la interfase que se forma por la presencia de un sustrato lipídico (hidrofóbico) en un medio acuoso (hidrofilico) (Jaeger et al., 1994; Wong, 1995; Svendsen, 2000).

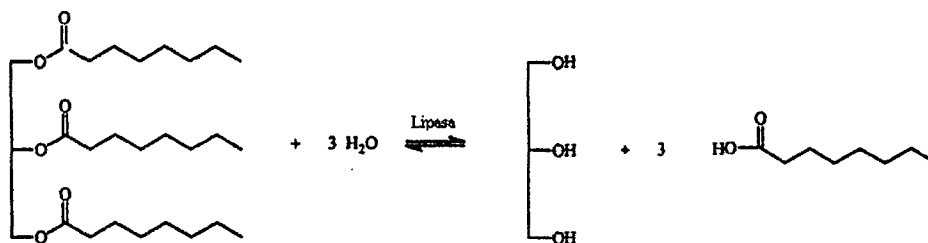


Figura 8. Reacción enzimática de la lipasa, donde cataliza la hidrólisis de un triacilglicerol.

Normalmente, las lipasas bacterianas pueden hidrolizar completamente un triacilglicerol aunque se ha observado cierta preferencia por los ésteres primarios.

Las diferentes lipasas bacterianas tienen pocas similitudes en su estructura primaria. Sin embargo, en su estructura tridimensional se observa que la mayoría tienen una estructura plegada α/β -hidrolasa; el centro catalítico se oculta dentro de una proteína que contiene una

tríada de aminoácidos característica y el centro activo esta cubierto por una estructura α -hélice en forma de tapadera que se mueve cuando la lipasa entra en contacto con el sustrato.

Esta estructura explica a nivel molecular lo específico que es el fenómeno de la activación interfacial. Los iones Ca^{2+} son de importancia para estabilizar la estructura tridimensional y tienen influencia en la actividad enzimática (Jaeger et al., 1994; Wong, 1995, Svendsen, 2000).

El término proteasa se refiere a todos los enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos. Este grupo de enzimas se puede dividir en exo y endopeptidasas, según si escinden las moléculas progresivamente desde el final de la cadena o en puntos específicos en el medio de la cadena, respectivamente. Las endopeptidasas también son conocidas como proteinasas (Figura 9) (Wong, 1995; Bugg, 1997).

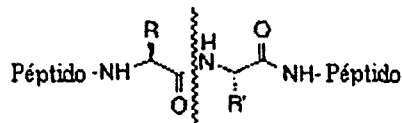


Figura 9. Reacción catalizada por una endopeptidasa

Las proteinasas se han clasificado en cuatro tipos según los grupos encontrados en el centro activo y que llevan a cabo la catálisis: serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico (3.4.23) y metaloproteinasa (EC 3.4.24). En este caso nos centraremos en las metaloproteinasa, ya que la proteasa de *Bacillus subtilis* (EC 3.4.24.28) evaluada en este trabajo es de este tipo (Wong, 1995).

Las metaloproteinasa se caracterizan porque requieren un ion metálico, usualmente zinc (Zn^{2+}) en su centro activo que está involucrado en el ciclo catalítico, aunque en su molécula también puede incluir otros iones como el Ca^{2+} . Estos enzimas se pueden distinguir fácilmente de otras clases si se tratan con agentes quelantes metálicos como el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) o la 1,10 fenantrolina, que llegan a inactivar totalmente el enzima porque secuestran el ion metálico (Wong, 1995).

La proteinasa de *Bacillus subtilis* (bacilolisina) estaba inicialmente incluida en el grupo (EC 3.4.24.4) al igual que otras proteinasas de especies de *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* y *Bacillus thermoproteolyticus*. El enzima más estudiado de este grupo es la termolisina, una endopeptidasa de 35 kDa producida por *Bacillus thermoproteolyticus*. Este enzima es muy parecido en su estructura y mecanismo de acción a la bacilolisina aunque más resistente al calor.

Algunos factores que pueden afectar en el aumento de la termoresistencia de estos enzimas son el número de enlaces entre puentes de hidrógeno; los aminoácidos que contiene la estructura que pueden variar la hidrofobicidad y el volumen de algunas partes de la molécula; y las perturbaciones que pueda haber alrededor del lugar donde se encuentra el calcio (Paupit et al., 1988; Sidler et al., 1986; Frigerio et al., 1996).

Efectos producidos en la leche por las lipasas y proteasas de microorganismos psicrótrofos

Las proteasas y lipasas producidas por bacterias psicrótrofas son bastante resistentes al calor y con frecuencia resisten los tratamientos de pasteurización o esterilización UHT causando ciertos defectos incluso en leche tratada (Visser, 1981; Cousin, 1982; Janzen et al., 1982). El deterioro de la leche pasteurizada debido a enzimas termoestables es de importancia limitada ya que el tiempo de conservación en refrigeración es relativamente corto; mientras que en el caso de la leche UHT, su vida útil está más directamente condicionada por la actividad de estos enzimas que, durante el almacenamiento, provocan la aparición de sabores desagradables y hacen que gelifique la leche (Bengtsson et al., 1973; Adams et al., 1976; Law et al., 1977; Mottar et al., 1979; Richardson y Newstead, 1979; Adams y Brawley, 1981; Mckellar y Cholette, 1984; Mottar, 1989; Varnam y Sutherland, 1995).

Las proteasas hidrolizan la caseína provocando la gelificación de la leche debido a la agregación de las micelas de caseína modificadas que forman una estructura de gel que incluye proteínas del suero y glóbulos grasos. En esta reacción también está implicada la plasmina. Además, el proceso UHT produce una alta proporción de micelas de pequeño tamaño, haciendo que la leche coagule con más facilidad. Los enzimas proteolíticos también son responsables de la aparición de olores desagradables y del desarrollo de sabores astringentes y amargos que se atribuyen a la formación de determinados polipéptidos resultado de la hidrólisis de la caseína (Adams et al., 1976; Mckellar y Cholette, 1984; Varnam y Sutherland, 1995).

Las lipasas generalmente no están involucradas en cambios estructurales de la leche; aunque debido a que provocan la hidrólisis de los triglicéridos causan la aparición de sabores y olores desagradables (rancidez hidrolítica) en leche y productos lácteos, así como de algunos defectos en la aptitud de la leche para su procesado. Algunos de los sabores y olores que desencadena la lipólisis se deben directamente a la liberación de ácidos grasos de cadena corta y media; otros sin embargo, son debidos a productos derivados de estos ácidos grasos libres, por oxidación y otras reacciones (San José y Juárez, 1983; Mottar, 1989; Varnam y Sutherland, 1995)

La población de bacterias psicrótrofas necesaria para producir cambios detectables en la leche varía dependiendo de los géneros y de las especies presentes. Aunque se han descrito defectos en la leche y en los productos lácteos con niveles comprendidos entre $1 \cdot 10^2$ y $1 \cdot 10^9$ ufc/ml (Tekinson y Rothwell, 1974), generalmente los cambios de aroma y sabor se perciben cuando la población excede de 10^6 ufc/ml (Punch et al., 1965; Richter, 1979). Aparte de los cambios de aroma y sabor (sabor rancio, pútrido, amargo,...) la presencia de enzimas extracelulares en la leche cruda también ocasiona algunos problemas tecnológicos durante el procesado y posterior almacenamiento (Reimerdes, 1982).

Durante la fabricación de quesos, el desarrollo de psicrotrofos y la producción de proteasa determina un rendimiento menor por pérdida de nitrógeno en el suero (Law, 1979; Fairbairn y Law, 1986), un acortamiento del tiempo de coagulación, una mayor firmeza de la cuajada (Cousin y Marth, 1977), y un desuerado más difícil (Juffs, 1974). Los ácidos grasos liberados durante la lipólisis de la grasa de la leche son importantes en el desarrollo del

sabor y aroma del queso (Mikolajoik, 1979). Sin embargo, la lipólisis excesiva por acción de las lipasas de las bacterias psicrotrofas origina la aparición de sabores y olores anómalos en queso (Law et al., 1976).

En el caso de la mantequilla, nata y mazada, la presencia de proteasas reviste poca importancia por el bajo contenido en proteína de estos productos. Sin embargo, la actuación de las lipasas es significativa, dado que liberan ácidos grasos durante el almacenamiento del producto, originando sabores a rancio y a jabón (Deeth et al., 1979).

PROCESADO TÉRMICO DE LA LECHE

La producción de leche en España se centra mayoritariamente en leche líquida no modificada excepto por el calentamiento. Las leches concentradas (condensadas o evaporadas) y desecadas (leche en polvo) por la acción del calor o, excepcionalmente, por liofilización (leche humana); así como las leches modificadas (leches medicamentosas, maternizadas, humanizadas, aromatizadas esterilizadas, fermentadas o acidificadas y reconstituidas) se producen en menor cantidad.

Para garantizar que la leche que se vende para el consumo humano es un producto sano es necesario desarrollar sistemas de manejo y procesado que destruyan todos los microorganismos patógenos y reduzcan la presencia de otros microorganismos. Debido a que las bacterias se multiplican más rápidamente en la leche caliente que en la leche fría, el primer paso para reducir el deterioro de la leche, dado que ésta abandona la ubre a la temperatura del cuerpo, es enfriarla hasta unos 4 °C (figura 4) (Porter, 1980).

La leche fresca resultante se transporta a las centrales lecheras para su procesado. Una vez allí, el medio más eficaz para destruir las bacterias de la leche es calentarla durante el tiempo necesario a una temperatura lo suficientemente alta como para matar a todos los organismos patógenos, sin afectar de manera importante a las propiedades físicas y químicas de la leche. Este es el principio de la pasteurización (Porter, 1980).

La pasteurización consiste en calentar la leche por debajo del punto de ebullición pero a una temperatura adecuada para destruir a los patógenos y reducir suficientemente el resto de microorganismos, para que pueda ser transportada, distribuida y consumida con seguridad. Existen dos tipos de pasteurización, la LTLT (Low Temperature Long Time) que consiste en aplicar tratamientos de larga duración (30 min) a temperaturas suaves (63°C), y la pasteurización HTST (High Temperature Short Time) que consiste en aplicar temperaturas más altas (71-75°C) durante tiempos cortos (15-20 s.). Después, la leche pasa a una sección de enfriamiento, donde, tras una refrigeración inmediata, se reduce su temperatura hasta alcanzar unos 4 °C. A continuación se produce un envasado aséptico en botellas (figura 4) (Porter, 1980; Madrid, 1996).

La esterilización puede ser de dos tipos: tradicional y UHT. En el primer caso, después de un precalentamiento de la leche a unos 80°C, ésta se envasa en botellas, que posteriormente, se llevan a un autoclave y se esterilizan a 115-120°C durante un tiempo que oscila alrededor de los 20-30 minutos (Madrid, 1996). De todas formas, en España, el proceso de esterilización que se aplica más habitualmente a las leches líquidas comerciales es el

sistema continuo a temperatura ultra-alta (UHT). En la esterilización UHT, la leche se calienta hasta 135-150° C durante unos segundos (2-4 s), se enfría y se envasa asépticamente (figura 4). Este proceso se puede aplicar a la leche de forma directa o indirecta. El tratamiento UHT directo consiste en la inyección de vapor directamente en la leche, seguido de una parcial evaporación y enfriamiento; mientras que, en el tratamiento indirecto, el intercambio térmico se realiza mediante intercambiadores de placas o tubulares (Porter, 1980; Madrid, 1996).

El procedimiento UHT consiste en aplicar temperaturas altas durante un tiempo corto, para eliminar todas las bacterias causando pocas modificaciones en el sabor y el color (Porter, 1980). La leche esterilizada por el sistema UHT se expende generalmente en envase laminado complejo de cartón, recubierto de plástico y forrado con una lámina de aluminio que asegura la opacidad del recipiente (Porter, 1980).

Efecto del tratamiento térmico en microorganismos y enzimas

Los tratamientos térmicos de pasteurización o esterilización han sido definidos en temperatura y tiempo para destruir principalmente los microorganismos patógenos procurando alterar lo menos posible la estructura física y química de la leche. A su vez, estos tratamientos inactivan enzimas que posiblemente causarían importantes alteraciones en la leche. Por ambas razones, la aplicación de calor consigue la prolongación de la conservación del producto que será mayor o menor según la intensidad del tratamiento.

Efecto sobre los microorganismos

Actualmente, se admite que la destrucción térmica de los microorganismos está relacionada con la degradación de los ácidos nucleicos y la desnaturalización de proteínas celulares (Veisseyre, 1988). Cuando se mantienen temperaturas de 65-70°C durante unos minutos, la mayoría de microorganismos que constituyen la flora banal de la leche son destruidos. Pero, existen ciertos microorganismos que pueden sobrevivir a los tratamientos de pasteurización, son los llamados termoresistentes (Veisseyre, 1988).

Entre las bacterias termoresistentes no esporuladas cabe destacar principalmente especies de los géneros: *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*. Alguno de los cuales además son termófilos (*S. termophilus*, *L. Termophilus*), pudiéndose desarrollar en leche pasteurizada insuficientemente refrigerada. Entre las bacterias termoresistentes esporuladas, las pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium* son los que pueden encontrarse con más frecuencia en la leche (Veisseyre, 1988).

Las levaduras y los hongos, incluso después de la esporulación, no presentan termoresistencia (Veisseyre, 1988).

Efecto sobre los enzimas

Los enzimas de la leche empiezan a inactivarse a partir de los 50°C, aunque el intervalo concreto de temperaturas depende de cada tipo de enzima. Esta característica permite utilizar determinados enzimas como indicadores de los tratamientos térmicos aplicados en la leche; así, por ejemplo, la inactivación de fosfatasa alcalina se suele utilizar como

indicador de la pasteurización baja (63°C-30 min). Durante la pasteurización alta (72-75°C, 15-20 s.), además de la inactivación de fosfatasa alcalina, se produce la inactivación de la lactoperoxidasa y de la mayoría de enzimas, a excepción de la proteasa nativa de la leche y de algunas lipasas y proteasas bacterianas. Con los tratamientos de esterilización, ya sean en botella o UHT, se consigue la inactivación de prácticamente la totalidad de los enzimas, excepto algunos de origen microbiano, como los producidos por bacterias psicrotrofas (Walstra y Jenness, 1987), aunque en ciertos casos (plasmina y fosfatasa alcalina) la desnaturalización es parcialmente reversible después del tratamiento UHT.

Efecto del tratamiento térmico en el valor nutritivo de la leche

Actualmente, el tratamiento térmico es uno de los métodos más eficaces para la conservación de los alimentos ya que reduce el recuento de microorganismos y inactiva los enzimas que podrían desestabilizar el alimento durante el almacenamiento. Pero también comporta una serie de inconvenientes, entre los cuales cabe citar (Veisseyre, 1988):

- Modificación de la estabilidad coloidal y de la emulsión de la grasa
- Modificación del color y gusto
- Disminución del contenido en biocatalizadores como enzimas y vitaminas

Los cambios nutricionales durante la pasteurización HTST o la esterilización UHT son limitados en la mayoría de los casos, aunque los efectos del procesado mediante UHT indirecto son mayores que los del UHT directo. El tratamiento que provoca cambios más importantes en el valor nutritivo de la leche es la esterilización en botella, aunque el grado de alteración varía considerablemente con la severidad del proceso (Varnam y Sutherland, 1995).

Efecto en las vitaminas

La leche pasteurizada o UHT muestra pérdidas de vitamina similares por efecto del tratamiento de conservación, aunque normalmente es mayor en la UHT. Las vitaminas liposolubles A, D, E y las hidrosolubles biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y riboflavina son relativamente estables al calor y no se observan pérdidas detectables durante la pasteurización o en la mayoría de los procesos UHT. Vitaminas como el ácido fólico, tiamina, vitamina B₆ y vitamina B₁₂ pueden sufrir pérdidas menores del 10-20% después de la pasteurización o el proceso UHT (en este caso la pérdida de vitamina B₆ puede ser mayor). La vitamina C es la que sufre las pérdidas más importantes, ya que su contenido puede reducirse un 5-25% durante la pasteurización y un 25% o más durante el proceso UHT (Tabla 4) (Mottar y Noudts, 1979; Haddad y Loewenstein, 1983; Alais, 1985; Lavigne, 1989; Varnam y Sutherland, 1995; Juárez, 1996).

Las pérdidas de vitaminas después de la esterilización en botella varían con el proceso aplicado, pero en la mayoría de los casos son importantes. El contenido en vitamina C se reduce un 30-100%, tiamina 20-50%, vitamina B₆ 15-50%, vitamina B₁₂ 20-100% y el ácido fólico un 30-50% (Tabla 4) (Alais, 1985; Lavigne, 1989; Amiot, 1991; Varnam y Sutherland, 1995; Juárez, 1996).

Tabla 4. Efectos de los tratamientos térmicos industriales sobre las vitaminas de la leche (Alais, 1985; Lavigne, 1989; Amiot, 1991; Varnam y Sutherland, 1995; Juárez, 1996)¹.

Vitaminas	Pasteurizada HTST	Esterilizada	
		Tradicional	UHT
Vitamina B ₁ (µg)	2-10	20-50	7-20
Vitamina B ₂ (µg)	0	<20-30	0
Vitamina B ₆ (µg)	<10	15-50	<20
Vitamina B ₁₂ (µg)	<10	20-100	<20
Ácido fólico	<10	30-50	<20
Vitamina C (µg)	5-25	30-100	10-30

porcentaje de pérdida

Efecto en las sales minerales

Hay dos tipos de sales según su comportamiento frente a los tratamientos térmicos; las que no sufren ninguna modificación como el sodio, potasio, cloruro y sulfato y a las que son modificadas como el calcio, magnesio, citrato y fosfato. El calentamiento afecta en el equilibrio de la distribución de las sales de calcio, lo que resulta en una disminución del calcio soluble y la precipitación del fosfato de calcio. En la pasteurización, estos efectos sólo tienen importancia en casos excepcionales, pero en el caso de la leche UHT, hasta un 40-50% del calcio soluble pasa a la fase coloidal, lo que dificulta su adsorción (Varnam y Sutherland, 1995).

Efecto en las proteínas y aminoácidos

El efecto de la pasteurización y de la esterilización UHT es limitado. Se inicia la reacción de Maillard, pero la pérdida de lisina disponible es baja, del 1-2% en leche pasteurizada y de 4-5.5% en leche esterilizada UHT. Pérdidas que no son significativas nutritivamente. Durante el proceso UHT también hay desnaturalización de las proteínas del suero, aunque esto no afecta en el valor nutritivo causa la aparición de sabor a cocido en la leche (Yufera, 1987; Varnam y Sutherland, 1995).

En el proceso de esterilización en botella la lisina disponible puede reducirse hasta un 13%. Además, a diferencia de la pasteurización o la esterilización UHT, en este caso hay formación de lisinoalanina, producto que es tóxico para determinados animales (Varnam y Sutherland, 1995).

Efecto en la lactosa

La formación de lactulosa incrementa con la temperatura del tratamiento térmico, los valores medios son de 50 mg/l en leche pasteurizada, 100-500 mg/l en leche esterilizada UHT y 900-1380 mg/l en leche esterilizada en botella. La diferencia en el contenido de

lactulosa puede ser usado como parámetro para distinguir la leche según el tipo de tratamiento que se le ha aplicado (Varnam y Sutherland, 1995).

Efecto en los lípidos

En general, los tratamientos térmicos no afectan a la materia grasa, aunque en algunos tratamientos a temperatura elevada se produce la agrupación de algunos glóbulos de grasa, produciéndose la degradación de glicéridos a δ -lactonas y metilcetonas que son causantes de la aparición de cambios en el gusto (Veisseyre, 1988).

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.M., Barach, J.T., Speck, M.L. 1976. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk in milk proteins and stability of milk proteins on ultra-high-temperature treatment. *J. Dairy Sci.*, 59, 823-827.
- Adams, D., Brawley, T. 1981. Heat Resistant Bacterial Lipases and Ultra-High Temperature Sterilisation of Dairy Products. *J. Dairy Sci.*, 64, 1951-1957.
- Alais, C.H. 1985. Ciencia de la leche, principios de técnica lechera. Ed. Reverté, Barcelona.
- Amiot, J. 1991. Ciencia y tecnología de la leche. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Aurand, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. 1987. Food composition and analysis. Ed AVI, USA.
- Badui, S.D. 1986. Química de los alimentos. Ed. Alhambra mexicana, México D.F.
- Bengtsson, K., Gardhage, L., Saksson, B.I. 1973. Gelation in UHT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat-resistant proteases. *Milchwissenschaft*, 28, 495-499.
- Bishop, J.R., White, C.H. 1986. Assessment of dairy product quality and potential shelf-life, a review. *J. Food Prot.*, 49, 739-753.
- Calvo, M.M. 1989. Efecto del tratamiento térmico sobre los componentes del suero de la leche. Tesis doctoral, Departamento de Nutrición y Bromatología III, Universidad Complutense de Madrid.
- Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic micro-organisms in milk and dairy products: A review. *J. Food Prot.*, 45, 172-207.
- Cousin, M.A., Marth, E.H. 1977. Cottage cheese and yogurt manufactured from milks precultured with psychrotrophic bacteria. *Cultured Dairy Prod. J.*, 10, 15-18, 30.
- Cousins, C.M., Bramley, A.J. 1987. Microbiología de la leche cruda. En: Microbiología lactológica. Vol. I. R.K. Robinson (ed). Ed. Acribia. Zaragoza.
- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H., Wood, A.F. 1979. Lipolysis and butter quality. *Aust. J. Dairy Technol.*, 34, 146-149.
- Fairbairn, D.J., Law, B. 1986. Purification and characterisation of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescens* NCDO 2085. *J. Dairy Res.*, 53, 457-466.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Ed. Thomson Science, London, UK.
- Frigerio, F., Margarit, I., Nogarotto, R., de Filippis, V., Grandi, G. 1996. Cumulative stabilizing effects of hydrophobic interactions on the surface of the neutral protease from *Bacillus subtilis*. *Protein Eng.*, 9(5), 439-445.
- Griffiths, M.W. 1989. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis

- by psychrotrophic bacteria during growth in milk. *Milchwissenschaften*, 44, 539-543.
- Griffiths, M.W., Philips, J.D. 1984. Effect of aeration on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophs growing in milk during refrigerated storage. *J. Food Prot.*, 47, 697-702.
- Haddad, G.S., Loewenstein, M. 1983. Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin and acid ascorbic content of milk. *J. Dairy Sci.*, 66, 1601-1606.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 29-63.
- Janzen, J.J., Bishop, J.R., Bodine, A.B. 1982. Relationship of protease activity to shelf-life of skim and whole milk. *J. Dairy Sci.*, 65, 2237-2240.
- Juárez, M. 1996. Leche y productos lácteos, aspectos nutricionales. *Alimentación, nutrición y salud*, 3 (3), 45-50.
- Juffs, H. S. 1974. Influence of proteinases produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* on manufacture and quality of Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 29, 74-78.
- Lavigne, C., Zee, J.A., Simard, R.E., Beliveau, B. 1989. Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins B₁, B₂ and C on the shelf-life of goat's milk. *J. Food Sci.*, 54 (1), 30-34.
- Law, B.A., Sharpe, M.E., Chapman, H.R. 1976. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 43, 459-468.
- Law, B.A., Andrews, A.T., Chapman, H.R. 1977. Gelation of UHT-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens*, isolated from raw milk. *J. Dairy Res.*, 44, 145-148.
- Law, B.A. 1979. Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.*, 46, 573-588.
- Luquet, M.F. 1991. Leche y productos lácteos. Ed. Acribia. Zaragoza. pp. 390.
- Madrid, A. 1996. Curso de industrias lácteas. AMV Ediciones, Mundi-Prensa libros S.A., Madrid.
- Mataix, F.J. 1996. Recomendaciones nutricionales y alimentarias para la población. Necesidades y limitaciones. *Alimentación, nutrición y salud*, 3 (3), 51-57.
- McKellar, R.C., CHOLETTE, H. 1984. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen and phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1224-1227.
- Mikolajcik, E.M. 1979. Psychrotrophic bacteria and dairy product quality. I. Major organisms involved and defects produced. *Cult. Dairy Prod. J.*, 14, 6-10.
- Mottar, J., Noudts, M. 1979. Quality of UHT milk compared with pasteurised and in-bottle sterilised milks. *Lait*, 59, 476.
- Mottar, J.F., Waes, G., Moermans, R., Noudts, M. 1979. Sensoric changes in UHT milk during uncooled storage. *Milchwissenschaft*, 34, 257-262.
- Mottar, J.F. 1989. Effect on the quality of Dairy Products. En: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. R.C. McKellar (ed) Ed. CRC Press Inc. Boca Ratón y Florida.
- Paupit, R.A., Karlsson, R., Picot, D., Jenkins, J.A., Niklaus-Reimer, A.S., Jansonius, J.N. 1988. Crystal structure of neutral protease from *Bacillus cereus* refined at 3.0 Å resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin. *J. Mol. Biol.*, 199, 525-537.
- Porter, J.W.G. 1980. Leche y productos lácteos. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 88.
- Punch, J.D., Olson, J.C., Jr., Thomas, E.L. 1965. Psychrophilic bacteria III. Population levels associated with flavor or physical change in milk. *J. Dairy Sci.*, 44, 43-46.

- Reimerdes, E.H. 1982. Changes in the proteins of raw milk during storage. En "Developments in Dairy Chemistry-1, Proteins". P.F. Fox (ed.). Ed. Applied Science Publishers, London y New York.
- Richardson, B.C., Newstead, D.F. 1979. Effect of heat-stable proteases on storage life of UHT milk. N.Z. J. Dairy Sci. Technol., 14, 273-279.
- Richter, R. 1979. Psychrotrophic bacteria and self-life. Am. Dairy Res., 41, 48-50.
- Santo Domingo, M.A. 1993. La leche y los productos lácteos en la dietética actual. Alimentaria, noviembre, 246, 29-32.
- Sidler, W., Niederer, E., Suter, F., Zuber, H. 1986. The primary structure of *Bacillus cereus* neutral proteinase and comparison with thermolysin and *Bacillus subtilis* neutral proteinase. Biol. Chem., 367(7), 643-657.
- Spreer, E. 1991. Lactología Industrial. Ed. Acribia. Zaragoza. pp. 617.
- Stadhouders, J. 1975. Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. Neth. Milk Dairy J., 29, 104-126.
- Suhren, G. 1989. Producer micro-organisms. En: Enzymes of psychrotrops in raw food. R.C. McKellar (ed.), Ed. CRC Press Inc. Boca Ratón y Florida.
- Svensen, A. 2000. Review. Lipase protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta 1543, 223-238.
- Talanen, M. 1995. Vitaminas y minerales en la salud y en la nutrición. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Tekinson, O.C., Rothwell, J. 1974. A study of the effect of storage at 5°C on the microbial flora of heat-treated market cream. J. Soc. Dairy Technol., 27, 57-62.
- Thomas, S.B., Thomas, B.F. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurised milk. Dairy Ind., 34, 351-355.
- Varnam, A.H., Sutherland, J.P. 1995. Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp. 476.
- Veisseyre, R. 1988. Lactología técnica. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Visser, S. 1981. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. Neth. Milk Dairy J., 35, 65-88.
- Walker, J.M., Gingold, E.B. 1988. Biología Molecular Y Biotecnología. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Walstra, P., Jeness, R. 1987. Química Y Física Lactológica. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Wong, D.W.S. 1995. Food Enzymes. Structure And Mechanism. Ed. Chapman & Hall,
- Yufera, P. 1987. Química agrícola III, alimentos. Ed. Alhambra, Madrid.

**PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA
INTENSIDAD DE CAMPO:**

➤ **Ingeniería del Proceso**

INTRODUCCIÓN

Los alimentos fluidos están compuestos principalmente por agua y nutrientes como proteínas, vitaminas, triglicéridos y minerales. Son, en general, conductores eléctricos ya que contienen altas concentraciones de iones que pueden ser transportadores de cargas eléctricas (Martín et al., 1994). Gracias a esta propiedad, a principios de siglo se consiguió procesar alimentos mediante la aplicación de electricidad con un considerable éxito (Beattie, 1915). Esta técnica de tratamiento de alimentos se ha ido perfeccionando con el tiempo y actualmente, el procesado mediante pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC) está dando buenos resultados en la destrucción de diversos microorganismos y enzimas (Barsotti et al., 1999; Wouters et al., 1997; Barbosa et al., 1999).

El equipo típico de procesado de alimentos líquidos mediante PEIAC consta de una fuente de alimentación de alta tensión, cuya misión es almacenar energía en un condensador y un interruptor que permite la descarga de esa energía en pulsos rápidos (μs) de alta tensión (decenas de kV) a un recipiente que contiene el alimento a tratar (cámara de tratamiento) (Martín et al., 1994; Zhang et al., 1995; Barbosa-Cánovas et al., 1998).

Cuando se aplica un campo eléctrico a la cámara de tratamiento que contiene el alimento, la polarización de las moléculas dipolares y el movimiento de los transportadores de cargas, como los iones, en el interior del producto, inducen corrientes capacitivas y resistivas (Riley & Watson, 1987; Zhang et al., 1995). Por tanto, la cámara de tratamiento conteniendo el alimento se puede considerar eléctricamente como un circuito con una *resistencia* y un *condensador* conectados en paralelo (RC) (Figura 1), ya que, el circuito que modeliza la polarización dieléctrica es un condensador y el que modeliza la conducción por transporte de cargas es una resistencia.

Por consiguiente, en el diseño del procesado por PEAIC y para conseguir una buena efectividad del mismo, las propiedades eléctricas de los alimentos adquieren gran importancia. La resistencia, la conductividad y las propiedades dieléctricas del alimento a tratar afectan en la forma en que los alimentos interactúan con el campo eléctrico (Lewis, 1993).

Propiedades eléctricas de los alimentos

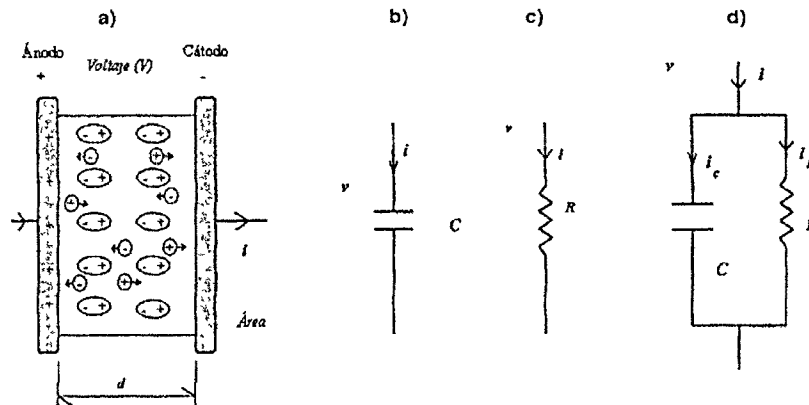
El alimento a tratar es un material conductor de cargas eléctricas. Cuando fluye corriente eléctrica a través de cualquier material conductor existe una relación directa entre la diferencia de potencial a través de éste (V) y la intensidad de corriente (I). La resistencia (R) de un conductor es la constante que relaciona ambos parámetros. Esta relación, denominada Ley de Ohm se resume en la ecuación 1 (Lewis, 1993).

$$R=V/I$$

Ecuación 1

La resistencia de un determinado material depende de su longitud, del área de su sección, del tipo de material y de la temperatura. Cada material tiene una resistencia específica, llamada resistividad (ρ), según el valor de ésta presentará mayor o menor dificultad al paso de la corriente eléctrica. El parámetro inverso es la conductividad (σ), y representa la facilidad que da un material al paso de corriente eléctrica (Tipler, 1994). La conductividad de un líquido aumenta con la fuerza iónica del medio y con la temperatura. El valor de la

conductividad molar de la mayoría de las soluciones incrementa en un 2 % aproximadamente con cada °C de cambio de temperatura (Lewis, 1993).



⊖→ Moléculas dipolares ⊖⊖ Anion ⊕⊕ Catión

- a) Corrientes de polarización dieléctrica y de transporte de cargas eléctricas
 b) Circuito equivalente de la conducción por polarización dieléctrica
 c) Circuito equivalente de la conducción por transporte de cargas eléctricas
 d) Circuito equivalente de una cámara de tratamiento conteniendo alimentos fluidos homogéneos

Figura 1. Circuito eléctrico de una cámara de tratamiento conteniendo una muestra alimenticia (Zhang et al., 1995).

La intensidad de campo eléctrico generada disminuye al aumentar la conductividad del alimento (Martín et al., 1994). Consecuentemente, un aumento en la fuerza iónica del alimento da como resultado una disminución en el nivel de inactivación de los microorganismos del mismo (Edebo et al., 1969; Vega-Mercado et al., 1996 y 1997). Y aunque un aumento de la temperatura también debería suponer el mismo efecto, se ha observado que no es así, sino al contrario, ya que se han observado efectos sinérgicos en la inactivación de microorganismos al tratar los productos a mayor temperatura (Wouters et al., 1999).

En la ecuación 2 se puede observar que la resistencia es función de la resistividad o la conductividad del producto a tratar (asumiendo que el alimento contenido en la cámara de tratamiento tiene propiedades eléctricas homogéneas)

$$R = d / \sigma A = \rho d / A$$

Ecuación 2

donde A es el área del electrodo (m^2), d es la distancia entre los dos electrodos paralelos (m), σ es la conductividad (siemens. m^{-1}) y ρ la resistividad ($\Omega.m$).

El alimento contenido en la cámara de tratamiento, además de comportarse como una resistencia, también se comporta como un condensador y por tanto puede almacenar carga eléctrica (Lewis, 1993). La cantidad de carga eléctrica (Q) que puede almacenar un condensador por unidad de diferencia de potencial (V) es su capacidad (C) (Tipler, 1994) (Ecuación 3).

$$C=Q/V$$

Ecuación 3

La constante dieléctrica relativa de un alimento, que se comporta como condensador, es la relación entre la capacidad del alimento a estudio y la capacidad del aire o del vacío bajo las condiciones estudiadas. Cuando aumenta la constante dieléctrica del alimento, éste, como condensador, puede almacenar una cantidad mayor de energía. La capacidad efectiva se pueden calcular mediante la ecuación 4.

$$C=\epsilon_0\epsilon_r A/d$$

Ecuación 4

Donde $\epsilon_0 = 8,84 \cdot 10^{-12}$ (F.m⁻¹) es la constante dieléctrica del vacío y ϵ_r es la constante dieléctrica relativa (adimensional).

La impedancia (Z) es un concepto que surge cuando se trabaja con corriente alterna y representa la oposición por parte de un aparato o de un circuito al paso de esta corriente a una determinada frecuencia (Plonus, 1982). Se puede representar como un número complejo donde la resistencia (R) es la parte real y la reactancia es la imaginaria. En un circuito, el condensador dará la reactancia capacitiva (χ_c) y la bobina dará la reactancia inductiva (χ_i). Dentro de la cámara de tratamiento no acostumbran a formarse corrientes inductivas, por lo que no habrá reactancia inductiva. Así pues, la impedancia se puede calcular como se indica en la ecuación 5.

$$Z = \sqrt{R^2 + \chi_c^2}$$

Ecuación 5

Se ha observado que la impedancia puede variar con las características del producto y la temperatura, Arántegui et al. (1999) observaron que este parámetro disminuía con la temperatura, y en zumo de melocotón, encontraron que la impedancia era mínima cuando el zumo contenía una concentración en pulpa del 10-12.5%.

Para conocer la eficacia con la que llega el voltaje transmitido a la cámara de tratamiento se utiliza la transmitancia (T), que representa la tensión que realmente se aplica a la cámara de tratamiento (Tipler, 1994). El coeficiente de transmisión (Tr) se define como el voltaje transmitido en relación al voltaje incidente (Ballo, 1997). La transmitancia debe ser próxima al 100% para conseguir un buen rendimiento del equipo. Ésta varía con las características del producto y la temperatura del medio a tratar (Arántegui et al., 1999).

Equipos para el tratamiento de alimentos

Conceptos generales

El procesado de alimentos mediante PEIAC está relacionado con una utilización mínima de energía y con un uso más eficiente de la misma que en los procesos térmicos, Qin et al. (1995a) calculó que la energía usada en el tratamiento de zumos de manzana mediante PEIAC era un 90% menor que la cantidad de energía usada en el método de procesado a altas temperaturas y tiempos cortos.

Los aspectos más importantes en esta tecnología son la generación de intensidades de campo altas, el diseño de cámaras para tratar el alimento de forma uniforme con el mínimo incremento de temperatura y evitando el fenómeno de electrólisis. Para que no haya un incremento elevado en la temperatura durante el tratamiento, se tiene que utilizar algún sistema de refrigeración o usar una frecuencia muy baja de aplicación de pulsos. Además, el uso de pulsos cortos reduce la cantidad de calor aportada al alimento (Zhang et al., 1995).

La fuerza de campo eléctrico (E), la duración del pulso (τ) y el tiempo de tratamiento (t) están definidos por las ecuaciones 6, 7 y 8; donde V es la diferencia de potencial entre dos puntos dados, R es la resistencia, C_0 es la capacidad del condensador y n es el número de pulsos.

$$E = V/d \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\tau = RC_0 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$t = n\tau \quad \text{Ecuación 8}$$

El proceso de descarga del condensador que da lugar al pulso de tensión sobre la cámara que contiene la muestra puede tener diferentes formas: caída exponencial, onda cuadrada y oscilatorio y en el caso de que se alterne o no la polaridad de la descarga se consiguen pulsos bipolares o unipolares, respectivamente. Las formas de pulso más comúnmente usadas son las de caída exponencial y las de onda cuadrada (Figura 2). Se ha observado que se consiguen mejores resultados en el nivel de inactivación microbiana con los de onda cuadrada (Qiu et al., 1998) ya que al aplicar este tipo de pulsos la intensidad de campo máxima se mantienen durante más tiempo que los de caída exponencial. Para poder obtener estos diferentes tipos de pulsos debe hacerse modificaciones en el equipo (Figura 3) (Qin et al., 1994).

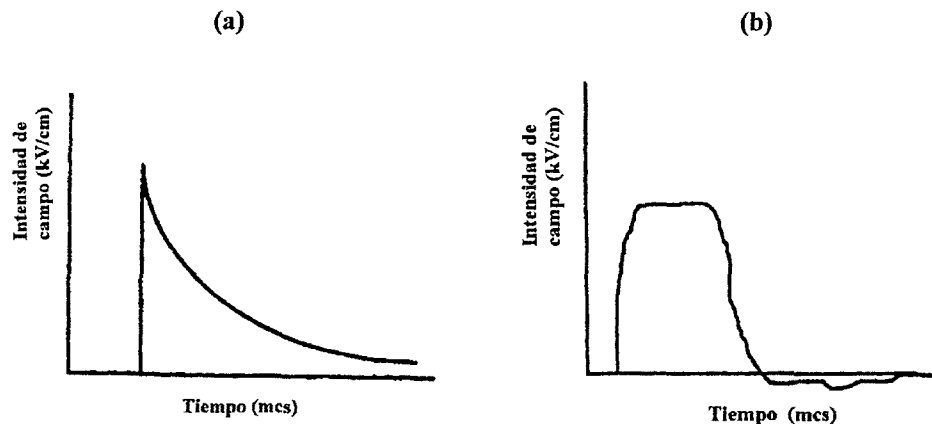


Figura 2. Pulsos de caída exponencial (a) y de onda cuadrada (b).

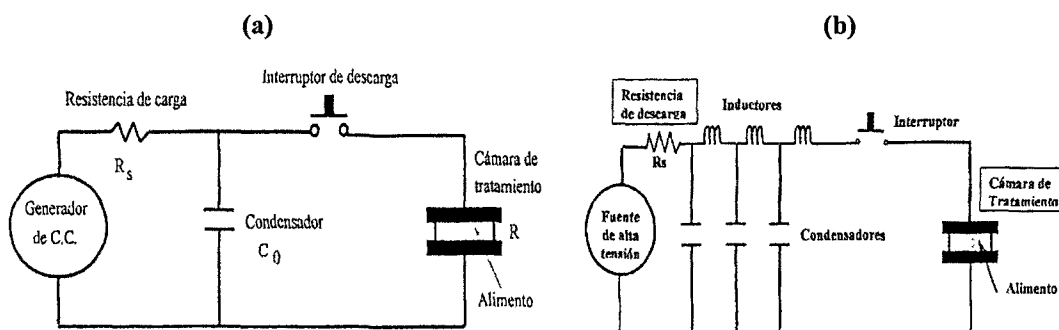


Figura 3. Circuitos simplificados para la generación de pulsos de caída exponencial (a) y onda cuadrada (b).

Existen varios sistemas, tanto para la generación de pulsos monopolares como bipolares, que permiten controlar los parámetros eléctricos que influyen en el proceso, además de la anchura de pulso o el tiempo que debe transcurrir entre dos pulsos (Universidad Estatal de Ohio, Thomson-CSF y Centralp) (Figura 4).

En lo concerniente a la polaridad del pulso, se ha observado que el empleo de pulsos unipolares provoca la formación de una capa protectora en los electrodos producida por la migración que sufren algunos componentes de los alimentos debido a la carga eléctrica que presentan. En esta capa suele crearse una intensidad del campo eléctrico significativamente mayor que el resto de la cámara, perdiéndose la uniformidad del campo eléctrico en su interior, lo que puede inducir la ruptura dieléctrica del alimento (arco eléctrico) con valores

nominales del campo eléctrico inferiores a los que serían de esperar en el caso de campo uniforme. El empleo de pulsos bipolares mediante la alternancia de la polaridad de los electrodos evita la formación de la mencionada capa protectora, aunque ello se consigue utilizando generadores de pulsos más complejos y costosos (Qin et al., 1994; Zhang et al., 1995).

Existe otro tipo de generadores que consiguen descargar pulsos con una parte positiva y una parte negativa. A diferencia de los pulsos bipolares, en este tipo de pulsos la reversión de la carga es instantánea y se ha observado que son mucho más eficaces para inactivar microorganismos que los de caída exponencial simple (Ho et al., 1997).

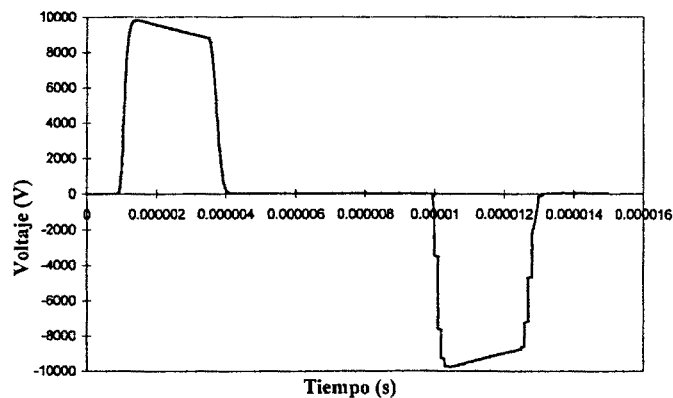


Figura 4. Ciclo de pulsos de diferentes polaridades (Equipo de la Universidad Estatal de Ohio).

Cámaras de tratamiento

La función principal de las cámaras de tratamiento es la creación de un campo eléctrico en su interior cuando contiene el alimento. Teniendo en cuenta que mediante su diseño se debe evitar al máximo la rotura dieléctrica del alimento y proporcionar una uniformidad de campo máxima, éstas no pueden ser totalmente estancas y deben permitir la refrigeración en caso necesario (Martín et al., 1994; Qin et al., 1995b; Zhang et al., 1995).

Al diseñar la cámara de tratamiento debe tenerse en cuenta la geometría de los electrodos y deberá elegirse el tipo de material a usar en la construcción de las cámaras, que deberá ser fácilmente lavable y esterilizable. Los electrodos, normalmente, son de acero inoxidable o grafito y el aislante suele ser de material polimérico o de cerámica. Por otra parte, el diseño de la cámara debe ser tal que permita fácilmente el llenado y vaciado de los alimentos. Además, dado que las burbujas de gas pueden inducir la formación de arcos eléctricos, se debe permitir la completa eliminación del aire durante el proceso de llenado (Martín et al., 1994).

La geometría de los electrodos (y, por extensión, de la cámara) puede ser muy variable, predominando los electrodos en forma de placas paralelas, cilindros concéntricos, cables paralelos y varillas (Hofmann, 1989). La geometría de placas paralelas es una de las más adecuadas por su simplicidad y la uniformidad del campo eléctrico que se crea en su interior (Martín et al., 1994)

Las cámaras de tratamiento de alimentos pueden ser diseñadas para trabajar por lotes o en continuo, dependiendo de si el alimento permanece en la cámara durante todo el tratamiento o si, en cambio, existe un flujo continuo del mismo a través de la cámara durante el intervalo de tiempo que dura el tratamiento, respectivamente. Sale y Hamilton (1967) y Dunn y Pearlman (1987) diseñaron cámaras estáticas que podían conseguir un campo máximo de 25 kV/cm. Grahl et al. (1992) diseñaron una cámara de este tipo donde se conseguía un campo de 30 kV/cm y Zhang et al. (1996) construyó una con la que se llegaba hasta campos de 40 kV/cm. En la Universidad de Lleida se han diseñado cámaras estáticas en cuyo interior se consigue una intensidad de campo uniforme y elevada a la vez que una buena transmitancia eléctrica. La cámara está formada por dos electrodos lisos, de acero inoxidable y dispuestos en paralelo, recubiertos con material aislante.

En cuanto a las cámaras de flujo continuo, pueden diseñarse tomando como base las estáticas. Sin embargo, debe tomarse en consideración la cantidad de energía aportada a la cámara y adecuar la velocidad de repetición del pulso a la velocidad de flujo del alimento. Puede hacerse necesaria la refrigeración durante el tratamiento, lo que normalmente se hace mediante agua (Martín et al., 1994).

Dunn y Pearlman (1987) diseñaron una cámara con 2 electrodos paralelos, que no estaban en contacto directo con el alimento, sino separados por unas membranas permeables a los iones (Figura 5). Otra cámara de tratamiento en continuo descrita por Dunn y Pearlman (1987) presenta varias zonas con electrodos separadas por un material aislante, donde la intensidad de campo eléctrico va variando a lo largo de la cámara según la posición en la que se encuentre el fluido (Figura 6).

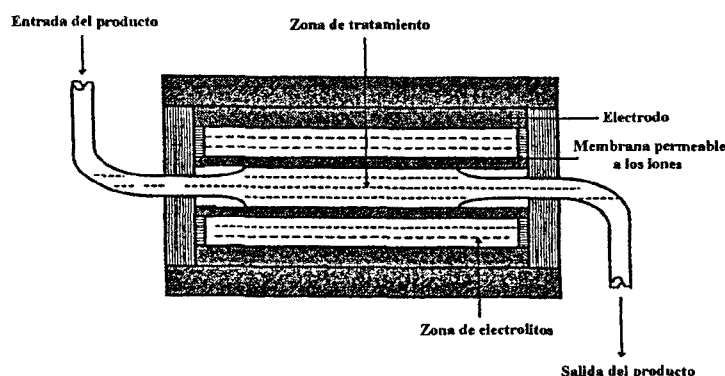


Figura 5. Esquema de la cámara de tratamiento en flujo continuo en la que los electrodos están separados por una membrana permeable a los iones (Dunn y Pearlmann, 1987).

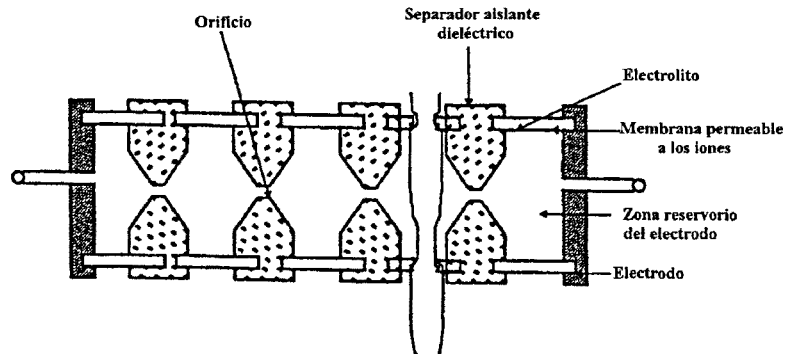


Figura 6. Esquema de la cámara de tratamiento en flujo continuo en la que la cámara tiene zonas reservorio de los electrodos (Dunn y Pearlmann, 1987).

En la Figura 7 se puede observar la cámara de tratamiento diseñada por Matsumoto et al (1991), en la que los electrodos circulares están separados por un placa de teflón con un orificio en el medio; la intensidad de campo eléctrico aplicada se concentra en este pequeño espacio.

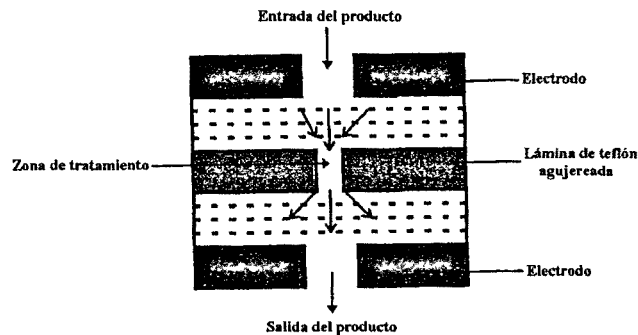


Figura 7. Cámara de flujo continuo diseñada por Matsumoto et al. (1991).

Zhang et al. (1995) describen una cámara de electrodos paralelos en la que el diseño se basa en una modificación de una cámara para tratamiento estático por adición de canales de flujo incluidos en el interior de la cámara (Figura 8).

Aunque en las cámaras de tratamiento de forma coaxial la intensidad de campo no es uniforme, se ha centrado mucho la atención en ellas debido a la uniformidad en el flujo del fluido y la simplicidad en la estructura de la cámara (Zhang et al., 1995) (Figura 9).

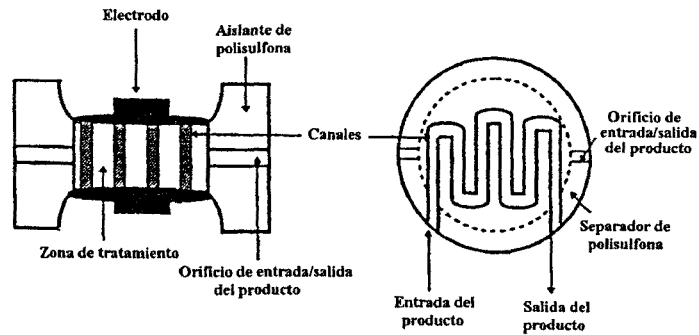


Figura 8. Cámara de flujo continuo de electrodos paralelos en la que el alimento fluye por una serie de canales (Zhang et al., 1995).

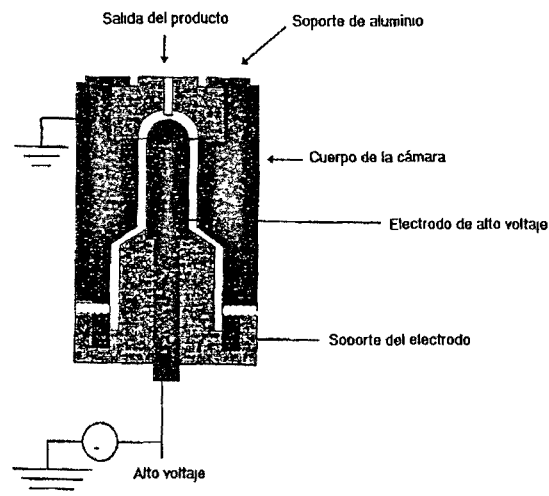


Figura 9. Cámara coaxial propuesta para un equipo de PEAC (Zhang et al., 1995).

En lugar de usar una única cámara de tratamiento, en la Universidad Estatal de Ohio se ha diseñado un sistema de varias cámaras dispuestas en serie en las que los electrodos pueden ser de diferentes formas (tubulares, cilíndricos, rectangulares, elípticas o con un diseño no uniforme) (Figura 10). El alimento se refrigera en el espacio entre cámaras (Yin et al., 1997).

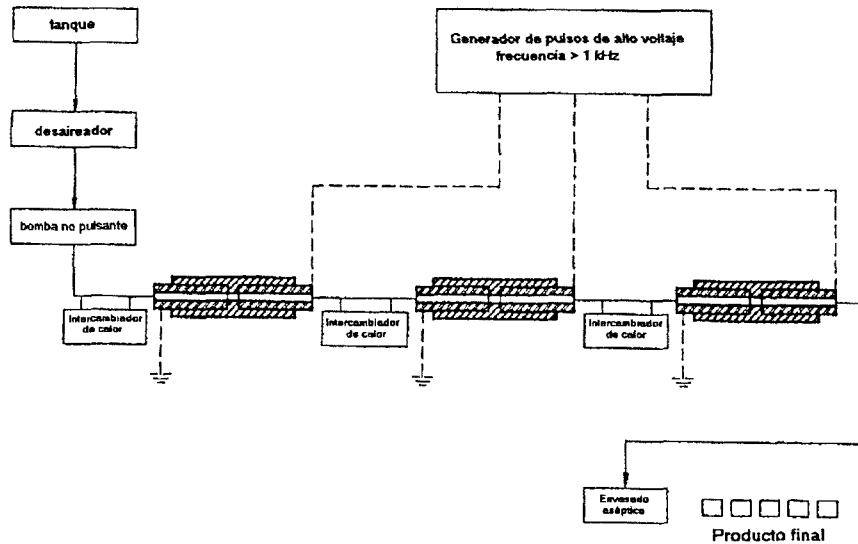


Figura 10. Equipo de tratamiento de alimentos líquidos por PEAIC mediante varias cámaras dispuestas en serie (Yin et al., 1997).

BIBLIOGRAFÍA

- Aránzategui, J. Rosell, J.R., Purroy, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. 1999. Electrical properties of peach juice and milk. European Conference of Emerging Food Science and Technology, Tampere, Finland.
- Ballo, D. 1997. Back to basics. Hewlett Packard.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., Swanson, B.G. 1998. Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker Inc., New York.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Góngora-Nieto, M.M., Pothakamury, U.R., Swanson, B.G. 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields. Food Science and Technology, International Series, Taylor S. L. (editor). Academic Press, San Diego, London, Boston.
- Barsotti, L., Cheftel, J.C. 1999. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. Food Reviews International, 15(2), 181-213.
- Beattie, J.M. 1915. Report on the electrical treatment of milk to the city of Liverpool. Liverpool: C. Tinling and Co.
- Centralp. 2000. Información técnica.
- Dunn, J.E., Pearlman, J.S. 1987. Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. US Patent nº 4,695,472.
- Edebo, L., Holme, T., Selin, I. 1969. Influence of the Conductivity of the Discharge Liquid on the Microbicidal Effect of Transient Electric Arcs in Aqueous Systems. Applied Microbiology, 1 (17), 59-62.

- Grahl, T , Sitzmann, W , Markl, J 1992 Killing of microorganisms in fluid media by high-voltage pulses In Kreysa G , Drisel X (eds), 10th Dechema Biotechnology Conference Series 5B, 675-678, Verlagsgesellschaft, Hamburg
- Ho, S Y , Mittal, G S , Cross, J D 1997 Effects of high electric pulses on the activity of selected enzymes Journal of Food Engineering, 31, 69-84
- Jeness, R., Koops, J 1962 Preparation of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate Netherlands Milk and Dairy Journal, 16 (3), 153-164
- Lewis, M J 1993 Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesamiento Editorial Acribia, Zaragoza
- Martin, O , Zhang, Q , Castro, A J , Barbosa-Canovas, G V , Swanson, B G 1994 Revisión Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos Microbiología e ingeniería del proceso Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria, 1 (34), 1-34
- Matsumoto, Y , Shioji, N , Satake, T , Sakuma, A 1991 Inactivation of microorganisms by pulsed high voltage application IEEE Conf Rec Ind Appl Soc Ann , 652-659 Ohio State University 2000 Información técnica
- Qin, B L , Zhang, Q , Barbosa-Cánovas, G V , Swanson, B G , Pedrow, P D 1994 Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms IEEE Transactions Dielectrics and Electrical Insulation, 1, 1047-1057
- Qin, B L , Chang, F J , Barbosa-Cánovas, G V , Swanson, B G 1995^a Non-thermal inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields Lebensmittel Wissenschaft und Technology, 28, 564-568
- Qin, B L , Zhang, Q , Barbosa-Cánovas, G V , Swanson, B G , Pedrow, P D 1995^b Pulsed electric field treatment chamber design for liquid food pasteurization using a finite element method Transactions of American Society of Agricultural Engineering, 38, 557-565
- Qiu, X , Sharma, S , Tuhela, L , Jia, M , Zhang, Q 1998 An integrated PEIAC Pilot Plant For Continuous Nonthermal Pasteurization of Fresh Orange Juice Agricultural Engineering, 41, 1069-1074
- Riley, T , Watson, A 1987 Polarography and other voltametric methods New York John Wiley and Sons
- Sale, A J H , Hamilton, W A 1967 Effect of high electric fields on microorganisms I Killing of bacteria and yeasts Biochimica and Biophysica Acta, 148, 781-788 Thomson-CSF 2000 Información técnica
- Tipler, P A 1994 Física Tomo II Editorial Reverté, Barcelona
- Vega-Mercado, H , Pothakamury, U R , Chang, F J , Barbosa-Cánovas, G V , Swanson, B G 1996 Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric field hurdles Food Research International, 29, 117-121
- Vega-Mercado, H , Martín-Belloso, O , Qin, B L , Chang, F J , Góngora-Nieto, M M , Barbosa-Cánovas, G V , Swanson, B G 1997 Non-thermal food preservation pulsed electric fields Trends in Food Science and Technology, 8, 151-157
- Wouters, P C , Smelt, J P P M 1997 Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields potential for food preservation Food Biotechnology, 11, 193-229
- Wouters, P C , Dutreux, N , Smelt, J P P M , Lelieveld, H L M 1999 Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. Applied And Environmental Microbiology, 65 (12), 5364-5371
- Yin, Y , Zhang, Q H , Sastry, S K 1997 High voltage pulsed electric field treatment

- chambers for the preservation of liquid food products. U.S. Patent n° 5,690,978.
- Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1995. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*, 25, 261-281.
- Zhang, Q., Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Pedrow, P.D. 1996. Batch Mode Food Treatment using Pulsed Electric Fields. US Patent n° 5,549,041.

**PROCESADO DE LECHE
MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS
DE ALTA INTENSIDAD DE CAMPO**

INTRODUCCIÓN

La aplicación de electricidad para la pasteurización de alimentos data de principios del siglo XX, aunque inicialmente, se aplicaba electricidad para conseguir un aumento de la temperatura y así, consecuentemente, la pasteurización.

El primer producto que se sometió a este tipo de tratamiento fue la leche, Beattie (1915) y Beattie y Lewis (1925) describieron un sistema para tratar leche con el que consiguieron resultados satisfactorios, y además, ésta fue usada para alimentación infantil. Posteriormente, en 1928, Fetterman trató leche mediante electricidad y consiguió inactivar los microorganismos *Tubercle bacilli* y *Escherichia coli* y en 1935, Getchell también pasteurizó este alimento calentándolo durante 15 segundos a 71°C mediante el paso de corriente alterna a 220 V. Durante esos años se consiguieron avances importantes en esta técnica de pasteurización ya que Moses (1938) estimó que entre 1928 y 1938, por lo menos 200 millones de litros de leche pasteurizados eléctricamente fueron consumidos sin efectos perjudiciales para la salud. Sin embargo, este sistema dejó de utilizarse sin ninguna razón aparente (Hall y Trout, 1968; Palaniappan et al., 1990; Martín et al., 1994).

En los años 50 resurgió el interés por las técnicas de pasteurización eléctrica y se llegaron a realizar gran variedad de estudios sobre un proceso de tratamiento denominado "tratamiento electrohidráulico", el cual consistía en aplicar descargas de alta intensidad de campo para provocar la ruptura dieléctrica en el producto, produciéndose así, la destrucción de microorganismos y enzimas, aunque al mismo tiempo, aparecían productos de electrólisis y se producían cambios en la composición de los alimentos (Palaniappan et al., 1990).

Aplicando este tratamiento, Gilliland y Speck (1967) consiguieron inactivar diversos microorganismos y enzimas. En 1967, Sale y Hamilton demostraron que los efectos producidos en los microorganismos no eran debidos a los productos de electrólisis generados ni al calor generado.

En la última década, han sido varios los estudios que se han realizado para conseguir mejorar esta técnica de pasteurización, llegando a patentarse varios sistemas de aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC) con los que conseguir la inactivación microbiana (Bushnell et al., 1991 y 1993; Zhang et al., 1996; Yin et al., 1997). Con estos equipos se han realizado tratamientos en diferentes tipos de muestras para observar el efecto producido en microorganismos, enzimas y otros componentes de los alimentos. El tratamiento se ha aplicado a soluciones tampón, a soluciones modelo de alimentos, y también, aunque menos, a productos reales.

Un producto tan consumido como la leche, además de ser el primer alimento con el que se experimentó, también ha sido uno de los productos sobre el que se han realizado más estudios. Distintos autores han evaluado el efecto del tratamiento eléctrico en este producto y han llegado a la conclusión que la inactivación microbiana depende de varios factores como la intensidad de campo y el número de pulsos aplicados en el proceso (Qin et al., 1995; Pothakamury et al., 1997; Martín et al., 1997).

Por otro lado, el tratamiento de enzimas mediante PEAIC ha producido resultados controvertidos, ya que en algunos casos se ha conseguido inactivar enzimas, mientras que en otros no se ha producido efecto alguno o incluso ha habido un incremento de la actividad enzimática (Castro et al., 1994; Vega-Mercado et al., 1995a, 1995b y 2001; Bendicho et al., 2001a y 2001b; Van Loey et al., 2001). Esta variedad de resultados sugiere la necesidad de continuar la investigación en este campo.

También se requieren más estudios para establecer el nivel de destrucción de otros

componentes como son las vitaminas y los aromas, ya que si esta técnica no altera el contenido inicial de estos componentes (Grahl y Märkl, 1996; Barsotti et al., 1999; Bendicho et al., 2002) podría implantarse en la industria para conseguir productos de alta calidad nutricional y sensorial.

Efectos de los PEAIC sobre los microorganismos de la leche

Se ha estudiado el efecto de este tratamiento en soluciones modelo de ultrafiltrado de leche (SMUL), en leche con diferentes contenidos en grasa y en yogur consiguiéndose reducir significativamente la concentración inicial de diversos microorganismos contaminantes de la leche.

En SMUL, se han conseguido inactivaciones significativas de diferentes microorganismos. Aplicando el tratamiento en muestras inoculadas con *Escherichia coli*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* se ha llegado a reducciones desde 4 hasta 9 ciclos logarítmicos (Zhang et al., 1995; Pothakamury et al., 1995; Qin et al., 1998).

Dunn et al. (1987) inocularon *E. coli* (8.1×10^6 ufc/ml) en leche homogeneizada y pasteurizada, consiguiendo inactivarla en un 99.91% después de 23 pulsos a aproximadamente 43 kV/cm, *Salmonella dublin* (3.8×10^3 ufc/ml) fue inactivada completamente con un tratamiento de 40 pulsos a 36.7 kV/cm. El tratamiento redujo la población de otras bacterias de la leche en menos de 20 ufc/ml. Ocho días después del tratamiento no se observó crecimiento de *S. dublin* teniendo almacenada la leche a 7-9°C. Asimismo el recuento total de bacterias aumentó hasta 400 ufc/ml, mientras que en la leche no tratada aumentó hasta 10^7 ufc/ml.

Por otro lado, también se ha tratado leche desnatada cruda. Ésta fue sometida a diferentes condiciones de tratamiento, consiguiéndose una vida útil de dos semanas, conservada en refrigeración (Qin et al., 1995). Raso et al. (1999) aislaron algunos microorganismos en leche cruda (*Corynebacterium sp.*, *Xanthomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp.* coagulasa negativo) y después de someterlos a PEAIC observaron que *S. aureus* y *Staphylococcus sp.* se inactivaron 4 y 2 ciclos, respectivamente; contrariamente, los otros dos microorganismos estudiados no mostraron reducción alguna. Puede decirse que la vida útil de la leche pasteurizada mediante PEAIC dependerá de la concentración inicial de estos microorganismos resistentes y de su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración (Raso et al., 1999)

Dunn y Pearlman (1987) aplicaron un tratamiento mediante PEAIC en yogur inoculado con *Lactobacillus brevis* y observaron una reducción de 2D en esta bacteria. A su vez, estudiaron el efecto después de inocular en este producto tres tipos diferentes de microorganismos (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Saccharomyces cerevisiae*), resultando también una reducción de 2D en todas ellas (Dunn y Pearlman, 1987).

Mecanismo de inactivación microbiana

Después de ver que este sistema podía destruir microorganismos en leche se intentó dilucidar el mecanismo de acción y los parámetros relacionados con la efectividad del tratamiento. El mecanismo por el cual se inactivan los microorganismos no está aún muy claro ya que existen diferentes teorías para explicar la formación de poros en la membrana

celular, algunas de ellas explican que el fenómeno de la electroporación empieza en la parte lipídica mientras que otras opinan que se inicia en la parte proteínica (Barbosa et al., 1999). De todas formas, el efecto de los PEaIC en la membrana celular se ha podido observar mediante microscopía electrónica en células *Staphylococcus aureus* suspendidas en SMUL; Pothakamury et al. (1996), después de efectuar un tratamiento de 64 pulsos a unas intensidades de campo de 20, 40 y 60 kV/cm en una muestra de SMUL inoculada con la bacteria, observaron que la superficie celular presentaba una apariencia rugosa y las células sometidas al tratamiento más energético presentaron rotura de la pared celular y pérdida de material citoplasmático. Así pues, el incremento de la inactivación microbiana al aumentar la intensidad de campo eléctrico está relacionada con el incremento del deterioro de las células y el mecanismo de inactivación es diferente del térmico.

Factores importantes en la efectividad del tratamiento mediante PEaIC

Factores relacionados con el proceso

El nivel de inactivación depende principalmente de la intensidad de campo y del tiempo de tratamiento aplicados (Figura 1). Diversos autores (Qin et al., 1998; Grahl y Märkl, 1996; Martín et al., 1997) observaron que el nivel de supervivencia de microorganismos en leche y SMUL, después de ser sometidos a tratamiento de PEaIC, se ajustaron a la ecuación de Hülshager (Hülshager et al., 1981). Ésta, es una ecuación de primer orden (Ecuación 1) que relaciona la intensidad de campo aplicada (E) y el tiempo de tratamiento (t) con el nivel de microorganismos supervivientes (S), incluyendo otros parámetros como son la intensidad de campo crítica específica (E_c), el tiempo de tratamiento crítico específico (t_c) y una constante propia de cada microorganismo (k), estas constantes dependen del tipo de célula a tratar y del medio en el que están suspendidas. Por encima de estos valores críticos, las fracciones de células supervivientes se reducen drásticamente (Hülshager et al., 1981).

$$S = \left(\frac{t}{t_c} \right)^{\left(\frac{E - E_0}{k'} \right)} \quad \text{Ecuación 1}$$

Además de la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento, en otros estudios en leche o productos similares se ha intentado relacionar el nivel de inactivación microbiana con otros parámetros; uno de ellos es la temperatura (Tabla 1). Pothakamury et al. (1996) sometieron SMUL inoculada con *E. coli* a PEaIC en un rango de temperaturas entre 3 y 40°C y observaron que el nivel de inactivación aumentó con la temperatura. Reina et al. (1998) también observaron que aumentando la temperatura de tratamiento a 50° C se conseguía mayor efectividad en el tratamiento de *Listeria monocytogenes* (Figura 2). Sensoy et al. (1997) obtuvieron un modelo cinético de inactivación que combina los parámetros intensidad de campo, tiempo de tratamiento y temperatura.

Tabla 1 Efectos de la temperatura en el nivel de inactivación de microorganismos en leche después de un tratamiento mediante PEAIC

Medio	Bacteria	Condiciones de tratamiento	Reducción microbiana (↓) y vida útil conseguidas	Referencia
SMUL	<i>Escherichia coli</i>	36 kV/cm 64 pulsos 3°C - 40°C	7°C ↓ 4D 20°C ↓ 5D	Pothakamury et al , 1996
Leche desnatada	<i>Salmonella dublin</i>	15-40 kV/cm 10-50°C	30°C, 25kV/cm ↓ 1D 50°C, 25kV/cm ↓ 2D	Sensoy et al , 1997
Leche entera	<i>Listeria monocytogenes</i>	30 kV/cm 600 μs	25°C ↓ 2,5 D 50°C ↓ 4D	Reina et al , 1998
SMUL	<i>Escherichia coli</i>	36 kV/cm, hasta 64 pulsos, 7, 20 y 33°C	7°C, 36 kV/cm, 16 pulsos ↓ 2-3D 20°C, 36 kV/cm, 8 pulsos ↓ 2,5D 33°C, 36 kV/cm, 8 pulsos ↓ 2,5D	Zhang et al , 1995
Leche desnatada cruda	Bacterias propias de leche cruda	PEAIC 50 kV/cm, 22 pulsos, 4 Hz Térmico 73°C	PEAIC vida útil de 11 días PEAIC + calor vida util de 15 días	Fernández-Molina et al , 2000

SMUL solución modelo de ultrafiltrado de leche

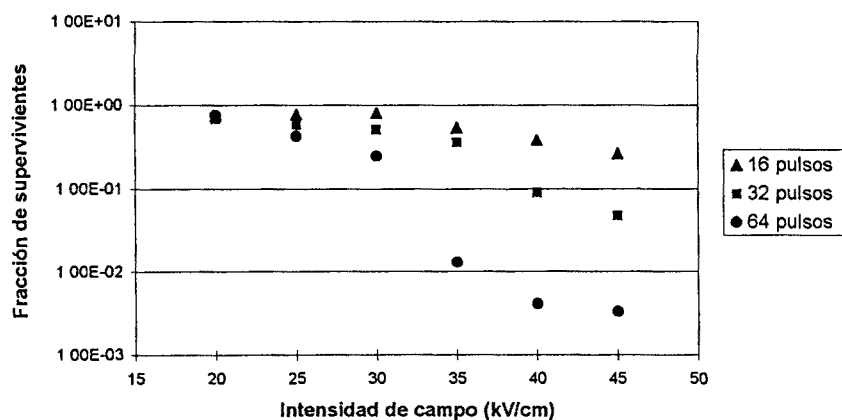


Figura 1 Inactivación de *E. coli* en leche desnatada mediante PEAIC aplicando tratamientos de diferente número de pulsos e intensidades de campo (Martín et al , 1997)

Las características del equipo también influyen en la efectividad del tratamiento. Aplicando condiciones similares de tratamiento se obtuvo mayor inactivación tratando la leche en flujo continuo que en un sistema estático. Martín et al (1997) observaron que aplicando un tratamiento de 64 pulsos a 45 kV/cm consiguieron inactivar en 3 ciclos logarítmicos la bacteria *E. coli* en leche desnatada, mientras que en un sistema en continuo

consiguieron reducir en 2 ciclos logarítmicos la concentración inicial aplicando 25 pulsos a 25 kV/cm. En cuanto al tipo de pulso, después de aplicar tratamientos similares en una muestra de SMUL inoculada con *E. coli*, se observó que los pulsos de onda cuadrada resultaron más letales que los de caída exponencial, ya que aplicando tratamientos de 100 μ s, aplicando pulsos de caída exponencial llegaron a 1 ciclo logarítmico de inactivación, en cambio con pulsos de onda cuadrada consiguieron hasta 3 D (Pothakamury et al., 1996).

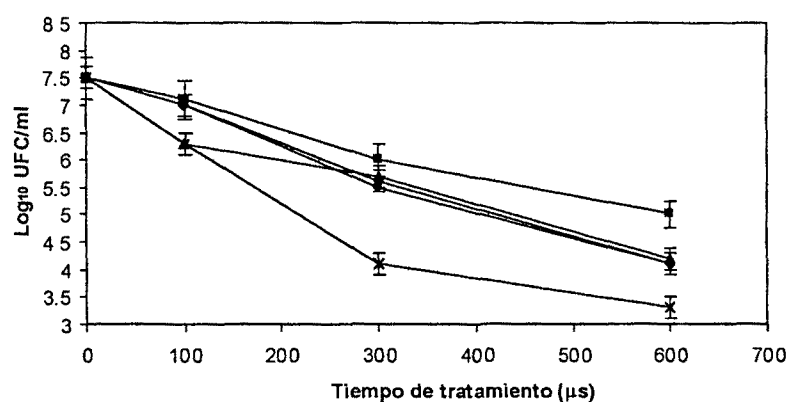


Figura 2. Inactivación de *Listeria monocytogenes* en leche entera mediante PEAIC a 10°C (●), 25°C (■), 30°C (◆), 43°C (▲), y 50°C (✕). Condiciones de tratamiento: intensidad de campo, 30 kV/cm; velocidad de flujo, 7 ml/s; anchura de pulso, 1.5 ms; frecuencia, 1700 Hz (Reina et al., 1998).

Factores relacionados con el inóculo y el medio a tratar

Varios investigadores han observado que la concentración inicial de inóculo puede afectar en la efectividad del tratamiento mediante PEAIC (Zhang et al., 1994 and 1995). En el caso de *E. coli* se ha llegado a la conclusión que la presencia de 1.15×10^3 - 7.14×10^8 ufc iniciales, no afectaba en los niveles de inactivación obtenidos (Zhang et al., 1995) (Figura 3), aunque estudios en otros productos han llegado a desmostrar lo contrario (Zhang et al., 1994; Jeantet et al., 1999). También el estado de crecimiento del microorganismo influye en el nivel de inactivación. Pothakamury et al. (1996) observaron que los microorganismos que se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento resultaron más sensibles a los pulsos que los que se encontraban en la fase de latencia o en la estacionaria.

El pH, también afecta significativamente en el efecto producido por los PEAIC, ya que en SMUL, la inactivación de *E. coli* fue significativamente mayor a pH 5.69 que a pH 6.82 (Vega-Mercado et al., 1996) (Tabla 2). La fuerza iónica juega un papel importante en la destrucción de *E. coli* ya que en SMUL 0.168 M obtuvieron 2.5 ciclos logarítmicos más de destrucción que en una solución 0.028M (Vega-Mercado et al., 1996) (Tabla 2).

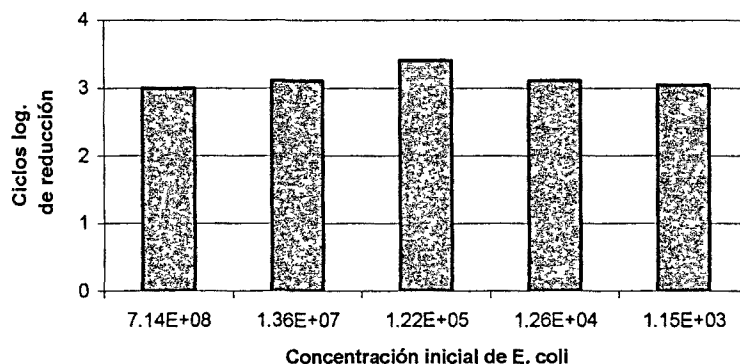


Figura 3. Inactivación de *E. coli* con diferentes concentraciones iniciales de inóculo. Se aplicaron 16 pulsos de 2 μ s a una intensidad de campo de 70 kV/cm (Zhang et al., 1995).

En cuanto al estudio de la efectividad de los PEaIC en diferentes medios de tratamiento (Tabla 2), Grahl y Märkl (1996) trataron leche con diferentes contenidos en grasa inoculadas con *S. cerevisiae*, *E. coli*, *L. brevis* y *P. fluorescens*. Comparando el tratamiento en los diferentes medios, se observó que los valores de intensidad de campo crítica (E_c) y de tiempo crítico de tratamiento (t_c), que son respectivamente, la intensidad de campo y el tiempo de tratamiento mínimos para que se inicie la inactivación, dependieron de las características de las células a tratar, así como del tipo de medio en el que estaban suspendidas. En este estudio observaron que las células de gran diámetro, como son las levaduras, se inactivaban a intensidades de campo menores que células menores como las bacterianas. Por otra parte, también destacaron que parecía que las partículas de grasa protegieran a las bacterias contra los pulsos eléctricos, ya que en una solución de alginato el t_c resultó mucho menor que en la leche. Martín et al. (1997) observaron que la inactivación de *E. coli* mediante pulsos eléctricos era más limitada en leche desnatada que en solución tampón cuando se exponen a condiciones similares de tratamiento debido a la compleja composición de la leche, su baja resistividad y la presencia de proteínas. También Reina et al. (1998) compararon el efecto de los PEaIC en diferentes tipos de leche e inocularon *Listeria monocytogenes* en leche pasteurizada desnatada, con 2% grasa y entera. Estudiaron los efectos que podía tener el contenido en grasa en el nivel de inactivación conseguido, pero no observaron diferencias significativas en los resultados.

Efectos de la combinación de PEaIC con otras tecnologías

Se ha observado que se pueden mejorar los resultados de inactivación conseguidos por los tratamientos mediante PEaIC combinándolos con otros tratamientos suaves. Fernández-Molina et al. (2000) consiguieron mejorar los resultados de vida útil obtenidos en leche, aplicando un tratamiento térmico suave previo al procesado mediante PEaIC y por otra parte, Sobrino et al. (2001) aplicando un tratamiento térmico suave después del tratamiento mediante PEaIC consiguieron una mayor reducción de la concentración en *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* que al aplicar únicamente un tratamiento mediante PEaIC.

Calderón-Miranda et al. (1999a) observaron que la adición de nisina a las muestras a tratar también mejoraba los niveles de inactivación conseguidos por los tratamientos mediante PEAIC; realizaron un estudio en el que inocularon *Listeria innocua* en leche desnatada y la sometieron a diferentes condiciones de tratamiento, seguidamente añadieron a las muestras concentraciones de nisina de 10 y 100 UI/ml. Se observó que la combinación de estos dos tratamientos conseguía efectos sinérgicos (Figura 4). También observaron mediante microscopía los distintos efectos que producían en las células bacterianas la utilización del tratamiento exclusivamente eléctrico o en combinación con nisina. Las primeras únicamente presentaban rugosidad en la pared celular, mientras que las muestras que además contenían 37 UI nisina/ml mostraban orificios y pérdida de citoplasma después de ser sometidas a la misma intensidad de campo. Cuando la intensidad de tratamiento aumentaba hasta 40 kV/cm las células sufrían ruptura de la pared y de la membrana celular y la combinación del tratamiento eléctrico con la adición de nisina provocaba pérdida de citoplasma. Asimismo, las muestras tratadas a 50 kV/cm no mostraron diferencias visibles entre las que tenían nisina y las que no (Calderón-Miranda et al., 1999b).

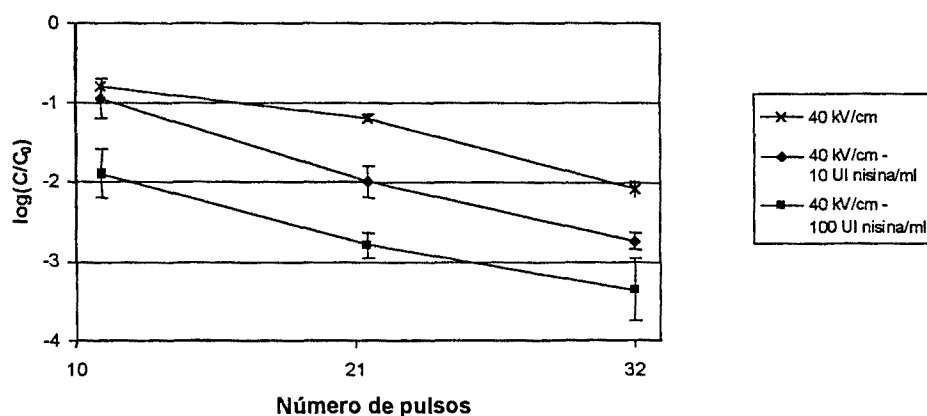


Figura 4. Inactivación de *Listeria innocua* mediante la aplicación de PEAIC y posterior adición de 10 o 100 UI nisina/ml a una intensidad de campo de 40 kV/cm (Calderón-Miranda et al., 1999).

Efecto de los PEAIC en los microorganismos esporulados

La inactivación de endosporas se ha observado que es insignificante, ya que no se detectaron efectos letales ni en *C. tyrobutyricum*, ni en *B. cereus* ni en *B. nivea* después de aplicar un tratamiento mediante PEAIC (Grahl y Märkl, 1996). Pagán et al. (1998) llegaron a la misma conclusión después de aplicar 75 pulsos de una intensidad de campo de 60 kV/cm a una suspensión de *B. subtilis* en SMUL, ya que no consiguieron destruir ninguna forma esporulada.

Coster y Zimmermann (1975), Dunn y Pearlman (1987) y Jayaram et al. (1992) realizaron estudios en leche para conseguir la inactivación de microorganismos esporulados, combinando los PEAIC con temperaturas moderadas y concluyeron que en la mayoría de ellos se producían efectos sinérgicos al combinarlos. Pero en el estudio de Pagán et al.

(1998) manteniendo la temperatura a 55-60°C no se consiguió la inactivación de las formas esporuladas. Tampoco consiguió efecto alguno la aplicación de un tratamiento térmico, previo al tratamiento mediante pulsos eléctricos, ni la combinación del tratamiento con la adición de hasta 5000 UI/ml de lisozima (Pagán et al, 1998). Sin embargo, el uso de altas presiones del orden de 1500 atm durante 30 min a 40 °C conducía a la iniciación de la germinación. Se concluyó que para conseguir la inactivación de esporas es necesaria una etapa intermedia entre la aplicación de altas presiones y los PEAC, que permitiera el desarrollo de las formas esporuladas en formas vegetativas.

Tabla 2. Efecto de las características de la leche en el grado de inactivación microbiana tras aplicar un tratamiento mediante PEAC

Medio	Bacteria	Condiciones de tratamiento	Efectos	Referencia
Leche 1,5% grasa Leche 3,5% grasa	<i>E coli</i> <i>L brevis</i> <i>P fluorescens</i>	5-15 kV, 5-20 pulsos	Menor contenido en grasa, mayor inactivación	Grahl y Märkl, 1996
SMUL Leche desnatada	<i>E coli</i>	¹ 64 pulsos de 1 8-6 μ s, 20-45 kV/cm ² 5-30 pulsos de 0 7-1 8 μ s, 15-25 kV/cm, 0 5 Hz	Menor inactivación en leche que en SMUL	Martín et al, 1997
Leche 3 5% grasa Leche 2% grasa Leche 0 2% grasa	<i>Listeria monocytogenes</i>	30 kV/cm, pulsos de onda cuadrada, 100-300-600 μ s, 1700 Hz	Inactivación similar en los diferentes tipos de leche	Reina et al, 1998
SMUL – pH 5 69 SMUL – pH 6 82	<i>E coli</i>	20-55 kV/cm, hasta 8 pulsos	Menor pH, mayor inactivación	Vega-Mercado et al, 1996a
SMUL 0 028 M-0 168 M	<i>E coli</i>	40 kV/cm, hasta 32 pulsos	Menor fuerza iónica, mayor destrucción	Vega-Mercado et al, 1996a

SMUL solución modelo de ultrafiltrado de leche

¹Tratamiento en cámara estática

²Tratamiento en cámara de flujo continuo

Efecto de los PEAC sobre los enzimas de la leche

En general, los enzimas requieren tratamientos de PEAC más severos que los microorganismos para obtener niveles de reducción significativa (Ho et al, 1997, Bendicho et al, 2001a). Sabiendo que algunos enzimas son útiles en la industria láctea se podría conseguir un control suficiente de los microorganismos dañando mínimamente a los enzimas mediante procesado por PEAC.

Se han realizado estudios en enzimas endógenas y exógenas de la leche (Tabla 3) y se ha llegado a la conclusión de que la variación de actividad enzimática depende de la intensidad de campo, número de pulsos aplicados en el proceso, y del enzima a tratar (Castro et al, 1994, Vega-Mercado et al, 1995a, 1995b y 2001, Grahl y Märkl, 1996, Bendicho et al,

2001a y 2001b) El nivel de inactivación enzimática también depende del tipo de muestra en que se encuentra (Castro et al , 1994, Vega-Mercado et al , 2001, Bendicho et al , 2001b), de la temperatura de tratamiento (Vega-Mercado et al , 1995a) y de la concentración de enzima (Castro et al , 1994)

La presencia de fosfatasa alcalina (FA) en leche pasteurizada térmicamente indica que el proceso ha sido incorrecto o que ha habido contaminación con leche cruda Castro et al (1994) añadieron FA a SMUL y a leche (entera, 2% grasa y desnatada) y sometieron las muestras a unas intensidades de campo de 22 y 18.8 kV/cm, respectivamente Observaron que la destrucción máxima en la actividad de la FA en leche desnatada y en solución modelo resultó de un 65% después de 70 pulsos a 22 kV/cm En leche pasteurizada con un contenido en grasa del 2% se redujo un 59% después de aplicar 70 pulsos a 18.8 kV/cm (Tabla 3) Aunque Grahl y Markl (1996), Ho et al (1997, y Van Loey et al (2001) no observaron una reducción significativa de la actividad de este enzima ni en leche ni en una solución acuosa La FA nativa es resistente a la proteólisis por tripsina, pero después del tratamiento mediante PEAIC, ésta fue susceptible a la digestión proteolítica por tripsina (Castro et al , 1994)

El comportamiento de la plasmina en SMUL después de un tratamiento mediante PEAIC fue estudiado por Vega-Mercado et al (1995a) Trataron muestras a diferentes intensidades de campo (15, 30 y 45 kV/cm) variando el número de pulsos (de 10 a 50 pulsos) y la temperatura de tratamiento (10 y 15°C) La actividad de la plasmina se redujo en un 90% después de 50 pulsos cuando se trató a 30 y 45 kV/cm, manteniendo el proceso a una temperatura de 15°C (Tabla 3)

En cuanto al tratamiento de enzimas exógenas, Vega-Mercado et al (2001) consiguieron un nivel de inactivación de una proteasa extracelular de *Pseudomonas fluorescens* del 80% tratando la muestra en caldo de tripton soja enriquecido con extracto de levadura La inactivación cambió significativamente cuando el enzima estaba en leche desnatada, entonces, campos bajos de 14 y 15 kV/cm y altas frecuencias de pulso (1 y 2 Hz) consiguieron un 40 y un 60% de inactivación después de 32 y 98 pulsos respectivamente (Tabla 3) El ensayo del enzima, suspendido en leche desnatada, a altas intensidades de campo eléctrico (25 kV/cm) y bajas frecuencias de pulso (0.6 Hz) producían un aumento de la actividad proteolítica La susceptibilidad de las caseínas de la leche desnatada a la proteólisis causada por proteasa sin tratar se incrementaba después del tratamiento con pulsos eléctricos Sin embargo, experimentos similares con tampón tris-caseína demostraron que no había una inactivación significativa de la proteasa y que no había un cambio significativo en la susceptibilidad de la caseína a la proteólisis

Bendicho et al (2001b), al procesar una proteasa de *Bacillus subtilis* en SMUL mediante un equipo de PEAIC en discontinuo consiguieron una reducción máxima de la actividad de un 10% Mientras que al aplicar el tratamiento en continuo la inactivación fue del 13-15% Por otro lado, cuando los tratamientos se llevaron a cabo en leche desnatada, al aplicar PEAIC en discontinuo no se produjo inactivación significativa de la proteasa y la variación de la actividad proteásica después del tratamiento en continuo dependió de la frecuencia de pulso (Bendicho et al , 2001b)

El efecto de los PEAIC sobre una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en SMUL también ha sido estudiado en equipos en discontinuo y en continuo de igual forma que en el caso de la proteasa de *Bacillus subtilis* (Bendicho et al , 2001a) Mediante procesado en discontinuo se consiguió hasta un 62.1% de reducción de la actividad lipásica (Figura 5), mientras que únicamente se llegó a un 13% de inactivación con un equipo de tratamiento de flujo

continuo (Bendicho et al., 2001a). Grahl y Märkl (1996) observaron una reducción sustancial del contenido de lipasa en la leche. En cambio, la peroxidasa no mostró inactivación alguna cuando se encontraba en leche (Grahl y Märkl, 1996; Van Loey et al., 2001), mientras que Ho et al. (1997) estudiando su comportamiento en una solución acuosa de fosfato observaron que se producía una reducción significativa del enzima (Tabla 3).

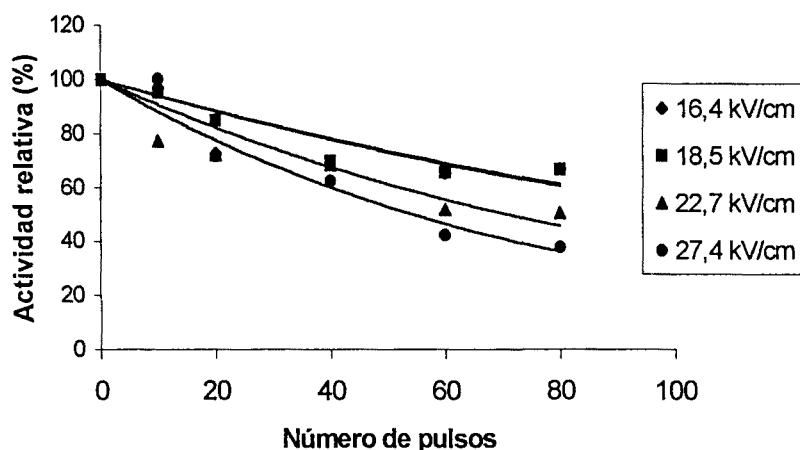


Figura 15. Reducción de la actividad de una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* después de haber sido sometida a diferentes tratamientos mediante PEAIC (Bendicho et al., 2001).

Efectos de la combinación de PEAIC con otras tecnologías

Debido a la resistencia de algunos enzimas a los tratamientos mediante PEAIC, se ha estudiado la posibilidad de combinar esta tecnología con otras técnicas como son la aplicación de calor suave o la acidificación del medio.

Bendicho et al. (2001c, 2001e) combinaron la acidificación del medio (pH 5) con la aplicación de un tratamiento mediante PEAIC en discontinuo y llegaron a conseguir una inactivación del 52% (60 pulsos a 27.4 kV/cm) en una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y cerca de un 30% de reducción en una proteasa de *Bacillus subtilis* (Tabla 3). Por tanto, en ambos casos la efectividad de los PEAIC se vió incrementada con la acidificación del medio.

Por otro lado, se estudió el aplicar un tratamiento de calor suave después del procesado mediante PEAIC para incrementar la inactivación de enzimas. Sin embargo, esta combinación no consiguió mejorar los niveles de inactivación conseguidos de los enzimas microbianos proteasa de *Bacillus subtilis* o lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Bendicho et al., 2001c, 2001d) (Tabla 3).

Tabla 3 Efecto de los pulsos eléctricos de alta intensidad de campo en los enzimas

Enzima	Medio ¹	Condiciones de tratamiento	Efectos	Referencia
Fosfatasa alcalina	SMUL Leche desnatada (LD) Leche 2% grasa (LSD) Leche entera(LE)	² 18 y 22 kV/cm, hasta 70 pulsos	SMUL y LD 65% inactivación LE y LSD 59% inactivación	Casiro et al, 1994
	Leche 1 5% grasa Leche 3 5% grasa	² 1 5 kV/cm, hasta 20 pulsos	< 10% inactivación	Grahl y Märkl, 1996
	Tampón pH 9 8	¹ 12-24 kV/cm, 30 pulsos	< 5% inactivación	Ho et al, 1997
	Leche cruda	² 6 7-20 kV/cm, hasta 200 pulsos	No inactivación (proceso a T° ambiente) 74% inactivación (proceso a 70°C)	Van Loey et al, 2001
Plasmuna	SMUL	³ 15-45 kV/cm, 10-50 pulsos	Hasta un 90% inactivación	Vega-Mercado et al, 1995a
Peroxidasa	Leche	² 1 5 kV/cm, hasta 20 pulsos	< 30% inactivación	Grahl y Märkl, 1996
	Fosfato de potasio 100 mM	³ 12-22 kV/cm, 30 y 100 pulsos	< 30% inactivación	Ho et al, 1997
	Leche cruda	¹ 13-19 kV/cm, hasta 200 pulsos	<3% inactivación (proceso a T° ambiente) 2-13% inactivación (proceso a 44-52°C)	Van Loey et al, 2001

¹SMUL solución modelo de ultrafiltrado de leche

²Tratamiento mediante PEAIC en cámara estática

³Tratamiento mediante PEAIC en cámara de flujo continuo

Tabla 3 (cont) Efecto de los pulso eléctricos de alta intensidad de campo en los enzimas

Enzima	Medio ¹	Condiciones de tratamiento	Efectos	Referencia
Proteasa de <i>P fluorescens</i>	Solución de caseína (SC) Leche desnatada (LD)	¹ 14-15 kV/cm, hasta 98 pulsos	LD 60% inactivación CS ningún efecto significativo	Vega Mercado et al, 1996b
		³ 25 kV/cm, hasta 16 pulsos	LD activación enzimática	
Proteasa de <i>B subtilis</i>	SMUL Leche desnatada(LD)	² 3 3/31 6 kV/cm, hasta 32 pulsos	SC ningún efecto significativo	Bendicho et al, 2001b
		¹ 16 4 -27 4 kV/cm, hasta 100 pulsos	SMUL 10% inactivación LD ningún efecto significativo	
		³ 17 6-25 2 kV/cm, hasta 100 pulsos	SMUL 15% inactivación LD efecto depende de la frecuencia	
SMUL	¹ 16 4 -27 4 kV/cm, hasta 60 pulsos + Acidificación (pH 5)	40% inactivación	Bendicho et al, 2001c	
SMUL	¹ 16 4 -27 4 kV/cm, hasta 60 pulsos + Tratamiento termico suave (63°C-5 min)	30% inactivación	Bendicho et al, 2001c	
Lipasa	Leche	² 1 5 kV/cm, hasta 20 pulsos	60% inactivación	Grahl y Markl, 1996
Lipasa de <i>P fluorescens</i>	SMUL	¹ 16 4 -27 4 kV/cm, hasta 100 pulsos	62% inactivación	Bendicho et al, 2001a
		³ 26 1-37 3 kV/cm, hasta 100 pulsos	13% inactivación	
SMUL	¹ 16 4 -27 4 kV/cm, hasta 60 pulsos + Acidificación (pH 5)	52% inactivación	Bendicho et al, 2001d	
SMUL	¹ 16 4 -27 4 kV/cm, hasta 100 pulsos + Tratamiento termico suave (63°C-15 min)	35% inactivación	Bendicho et al, 2001e	

¹SMUL solución modelo de ultrafiltrado de leche

²Tratamiento mediante PEAIC en cámara estática

³Tratamiento mediante PEAIC en cámara de flujo continuo

Efecto de los PEaIC en la calidad de la leche y en su composición en micronutrientes

Se cuenta con pocos estudios relativos a los efectos que produce el tratamiento mediante PEaIC a nivel sensorial y de componentes minoritarios de los alimentos. Sería interesante poder establecer con mayor seguridad el efecto de los PEaIC sobre estos componentes. Se ha dicho que por no intervenir temperaturas altas, este tratamiento produce poca destrucción de estos componentes. Si esto es así, y además se consigue la pasteurización a nivel microbiológico, se podría obtener una nueva gama de productos con mejores propiedades nutritivas y sensoriales.

Qin et al. (1995) trataron con pulsos eléctricos leche pasteurizada con un 2% en grasa y la envasaron asépticamente, almacenándola seguidamente a 4°C para realizar estudios de vida útil. Ésta mostró una vida útil desde el punto de vista microbiológico de 2 semanas, además el tratamiento no afectó a las propiedades físicas ni químicas de la leche. Las evaluaciones sensoriales realizadas indicaron que no existían diferencias entre la leche pasteurizada térmicamente y la tratada mediante PEaIC, aunque no pudieron realizar la comparación con leche cruda, por no estar permitido el consumo de ésta sin tratar (Qin et al., 1995)

Se conocen pocos estudios respecto al efecto de los PEaIC sobre las vitaminas en la leche, Bendicho et al. (2002) evaluaron el efecto de la aplicación del tratamiento en las vitaminas hidrosolubles (ácido ascórbico, riboflavina y tiamina) y liposolubles (colecalfiferol y tocoferol) en leche. Se aplicaron hasta 100 pulsos a una intensidad de campo de 16 a 27.1 kV/cm, manteniendo la temperatura máxima de tratamiento en 30°C. Se observó que las vitaminas no se destruyeron significativamente con un tratamiento de hasta 40 pulsos aplicando la máxima intensidad de campo (27.1 kV/cm), aunque al sobrepasar este número de pulsos se observó una ligera destrucción de la vitamina C. Grahl y Märkl (1996) observaron que el contenido de ácido ascórbico en la leche se reducía considerablemente después del tratamiento, mientras que la vitamina A no mostró inactivación y el sabor no sufría cambios significativos.

BIBLIOGRAFÍA

- Barbosa-Cánovas, G.V., Góngora-Nieto, M.M., Pothakamury, U.R., Swanson, B. 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields. In S. L. Taylor, Food Science and Technology Int. Series. Academic Press, San Diego, London, Boston.
- Barsotti, L., Cheftel, J.C. 1999. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. Food Reviews International, 15(2), 181-213.
- Beattie, J.M. 1915. Report on the electrical treatment of milk to the city of Liverpool. Liverpool: C. Tinling and Co.
- Beattie, J.M., Lewis, F.C. 1925. The electric current (apart from the heat generated). A bacteriological agent in the sterilization of milk and other fluids. Journal of Hygiene, 24, 123-137.
- Bendicho, S., Estela, C., Giner, J., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. 2001a. Effect of high intensity pulsed electric field and thermal treatments on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Dairy Science, 85: 19-27.
- Bendicho, S., Martí, G., Fernández-Molina, J.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O.

- 2001b. Effect of high intensity pulsed electric fields on a protease from *Bacillus subtilis*. IFT Annual Meeting Technical Programme, Institute of Food Technologists, New Orleans, Louisiana.
- Bendicho, S., Estela, C., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. 2001c. Efectos de la combinación de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo, calor y acidificación en una proteasa de *Bacillus subtilis*. Proceedings of the III Iberoamerican Congress of Food Engineering, in press. Valencia, Spain.
- Bendicho, S., Estela, C., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. 2001d. Combined effects of high intensity pulsed electric fields and mild heat on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. IFT Annual Meeting Technical Programme, Institute of Food Technologists, New Orleans, Louisiana.
- Bendicho, S., Estela, C., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. 2001e. Combined effects of high intensity pulsed electric fields and acidification on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. Proceedings of the AIChE Annual Meeting, in press. Reno, Nevada, USA.
- Bendicho, S., Espachs, A., Arántegui, J., Martín, O. 2002. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research*, in press.
- Bushnell, A.H., Dunn, J.E., Clark, R.W. 1991. High pulsed voltage systems for extending the shelf life of pumpable food products. US Patent n° 5,048,404.
- Bushnell, A.H., Dunn, J.E., Clark, R.W., Pearlman, J.S. 1993. High pulsed voltage systems for extending the shelf life of pumpable food products. US Patent n° 5,235,905.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1999a. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 19-30.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1999b. Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 31-38.
- Castro, A.J. 1994. Pulsed electric field modification of activity and denaturation of alkaline phosphatase. Ph.D. thesis, Washington State University, Pullman, Washington.
- Coster, H.G.L., Zimmermann, U. 1975. The mechanism of electrical breakdown in the membrane of *Valonia uricularis*. *Journal of Membrane Biology*, 22, 73-90.
- Dunn, J.E., Pearlman, J.S. 1987. Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. US Patent n° 4,695,472.
- Fernández-Molina, J.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 2000. Pasteurization of skim milk with heat and pulsed electric fields. Annual IFT Meeting, Institute of Food Technologists, Dallas, Texas.
- Fetterman, J.C. 1928. The electrical conductivity method of processing milk. *Agricultural Engineering*, 4 (9), 407-408.
- Getchell, B.E. 1935. Electric pasteurization of milk. *Agricultural Engineering*, 16, 408-410.
- Gilliand, S.E., Speck, M.L. 1967. Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. *Applied Microbiology*, September, 1031-1037.
- Grahl, T., Märkl, H. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 148-157.
- Hall, C.W., Trout, G.M. 1968. Milk pasteurization. AVI, N.Y.: Van Nostrand. Reinld.
- Ho, S.Y., Mittal, G.S., Cross, J.D. 1997. Effects of high electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Engineering*, 31, 69-84.
- Hülshager, H., Potel, J., Niemann, E.G. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high

- field strength. *Radiation and Environmental Biophysics*, 20, 53-65.
- Jayaram, S., Castle, G.S.P., Margaritis, A. 1992. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1412-1420.
- Jeantet, R., Baron, F., Nau, F., Roignant, M., Brulé, G. 1999. High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Protection*, 12 (62), 1381-1386.
- Martín, O., Zhang, Q., Castro, A.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1994. Revisión: Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos. *Microbiología e ingeniería del proceso. Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 1 (34), 1-34.
- Martín, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Engineering*, 20, 317-336.
- Moses, B.D. 1938. Electric pasteurization of milk. *Agricultural Engineering*, 12, 525-526.
- Pagán, R., Esplugas, S., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1998. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Science and Technology International*, 4, 33-44.
- Palaniappan, S., Sastry, S.K. 1990. Effects of electricity on microorganisms: a review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 14, 393-414.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1995a. High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 35, 101-107.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1995b. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Research International*, 28, 167-171.
- Pothakamury, U.R., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1996. Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 59, 1167-1171.
- Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Spence, K.D. 1997. Ultrastructural changes in *Staphylococcus aureus* treated with pulsed electric fields. *Food Science and Technology International*, 3, 113-121.
- Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Vega, H., Martín, O., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1995. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technology*, 49, 55-60.
- Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Pedrow, P.D., Olsen, R.G. 1998. Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE Transactions Industry Applications*, 34, 43-50.
- Raso, J., Góngora, M.M., Calderón, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1999. Resistant microorganisms to high intensity pulsed electric field pasteurization of raw skim milk (abstract). Annual IFT Meeting, Institute of Food Technologists, Chicago, Illinois.
- Reina, L.D., Jin, Z.T., Zhang, Q.H., Yousef, A.E. 1998. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protection*, 61(9), 1203-1206.

- Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. 1967. Effect of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica and Biophysica Acta*, 148, 781-788.
- Sensoy, I., Zhang, Q., Sastry, S.K. 1997. Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Engineering*, 20, 367-381.
- Sobrino, A., Rosell, J.R., Bendicho, S., Sanchis, V., Martín, O. 2001. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in milk by pulsed electric fields and moderate heating. Nizo Dairy Conference, Ede, The Netherlands.
- Van Loey, A., Verachtert, B., Hendrickx, M. 2001. Pulsed electric field and enzyme inactivation?. International Seminar "Electric Field Processing- the Potential to Make a Difference" (Personal Communication), Chipping Campden, UK.
- Vega-Mercado, H., Powers, J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1995a. Plasmin inactivation with pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 60, 1143-1146.
- Vega-Mercado, H., Powers, J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Luedecke, L. 1995b. Inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 using high voltage pulsed electric fields. Annual IFT Meeting Technical Programme, Institute of Food Technologists, Anaheim, California.
- Vega-Mercado, H., Pothakamury, U.R., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric field hurdles. *Food Research International*, 29, 117-121.
- Vega-Mercado, H., Powers, J.R., Martín-Belloso, O., Luedecke, L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 2001. Change in susceptibility of proteins to proteolysis and the inactivation of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 when exposed to pulsed electric fields. In G.V. Barbosa-Cánovas and Q.H. Zhang "Pulsed electric fields in food processing: Fundamental aspects and applications" (Chapter. 7). Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, PA, USA.
- Yin, Y., Zhang, Q.H., Sastry, S.K. 1997. High voltage pulsed electric field treatment chambers for the preservation of liquid food products. US Patent n° 5,690,978.
- Zhang, Q., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* and *Sacharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineering*, 37, 581-587.
- Zhang, Q., Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1995. Inactivation of *Escherichia coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation*, 19, 103-118.
- Zhang, Q., Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Pedrow, P.D. 1996. Batch mode food treatment using pulsed electric fields. US Patent n° 5,549,041.

IV

**VALIDACIÓN DE
MÉTODOS ANALÍTICOS**

INTRODUCCIÓN

Validar un método de análisis sirve para asegurar que las características del método son adecuadas y demostrar que el método es científicamente correcto en las condiciones que será aplicado y consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos. De hecho, la definición que proporciona la Norma ISO 8402 (ISO, 1994) es la siguiente: “la validación es la confirmación mediante el examen y la provisión de evidencias objetivas que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico determinado” (ISO 8402, 1994).

La Norma ISO 17025 obliga a validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados internamente, los métodos normalizados utilizados fuera de su campo de aplicación y las ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados. Los requisitos previos para llevar a cabo una validación son: mantener unas buenas prácticas de laboratorio; el desarrollo de un procedimiento analítico probado y documentado; así como la existencia de instrumental calibrado, de personal formado y de un protocolo de validación (IQS, 1998). Los resultados de la validación de un método pueden usarse para juzgar la calidad, fiabilidad y consistencia de los resultados analíticos; y es una parte integrante de cualquier buena práctica analítica (Huber, 1999).

Los parámetros para la validación de métodos se han definido en diferentes grupos de trabajo de comités nacionales e internacionales. Desafortunadamente, algunas de las definiciones varían entre las diferentes organizaciones. Hubo un intento de armonización para aplicaciones farmacéuticas a través del ICH (International Conference on Harmonization), donde representantes de la industria y de agencias de reglamentación de los Estados Unidos, Europa y Japón definieron los parámetros, requisitos y hasta cierto punto, la metodología para la validación de métodos analíticos. Los parámetros definidos por la ICH y por otras organizaciones y autores están resumidos en la tabla 1 y se describen a continuación (Huber, 1999).

Tabla 1. Posibles parámetros analíticos para la validación de métodos analíticos*

Especificidad
Linealidad
Precisión
Exactitud
Límite de detección
Límite de cuantificación
Rango

*Incluidos en las publicaciones de la ICH

PARÁMETROS A EVALUAR

Especificidad/Selectividad

Los términos especificidad y selectividad se usan indistintamente, aunque presentan pequeñas diferencias, ambos indican la capacidad de un método para determinar un analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla (Welac/Eurachem, 1993).

No siempre es posible demostrar que un método analítico es específico para un determinado analito (discriminación absoluta). En algunos casos, es necesario combinar dos o más procedimientos analíticos para conseguir el nivel necesario de discriminación (ICH, 1996).

Las pruebas a realizar para asegurar la especificidad o selectividad del método pueden ser diferentes en función del tipo de muestra a analizar, la técnica utilizada, la información bibliográfica disponible, entre otras. Entre las pruebas más utilizadas se encuentran las siguientes:

-Pruebas de identificación: pruebas para discriminar entre compuestos de estructuras similares que puedan estar presentes en la muestra. La discriminación de un método se puede confirmar mediante la obtención de resultados positivos de muestras que contengan el analito aparejados con resultados negativos de muestras que no contengan el analito (ENAC, 1996; ICH, 1996).

-Pruebas del ensayo y de impurezas: si se dispone de las impurezas a evaluar se puede comparar los resultados de la muestra que contiene las posibles interferencias con el resultado de otra muestra sin dichas interferencias. Si no se dispone de las impurezas, se puede comparar los resultados obtenidos por un método con los resultados obtenidos por otro método (método de confirmación) (ENAC, 1996; ICH, 1996).

Linealidad/Función respuesta

La linealidad se puede definir como la capacidad que tiene un método analítico de obtener, dentro de un intervalo determinado, resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito (sustancia a analizar) en la muestra (Eurachem, 1998).

Dentro del rango de trabajo, debe existir un rango en el que la respuesta sea lineal. Dentro de este rango la respuesta de la señal tendrá una relación lineal con la concentración de analito. Debe destacarse que los cálculos de regresión son insuficientes para establecer la linealidad; debe hacerse por lo menos una inspección visual de la línea y de los residuales (Eurachem, 1998). La ICH recomienda, para que las evaluaciones sean rigurosas, reportar el coeficiente de correlación de la curva, el valor de la ordenada en el origen, la pendiente de la línea de regresión y la suma de cuadrados de los residuales. También debe incluirse en el informe un gráfico de los resultados. Además un análisis de la desviación de los datos respecto a la línea de regresión también es útil para evaluar la linealidad (Huber, 1999).

Precisión

La precisión de un método analítico es el parámetro que expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea y en unas condiciones preestablecidas, constantes y determinadas en una zona definida de valores. Es decir, expresa la distribución de los valores analíticos alrededor de su media (AEFI, 1989; Hernández, 1992).

Las dos medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y reproducibilidad. Ambas representan las dos medidas extremas de precisión que se pueden obtener. La repetibilidad da una idea del tipo de variabilidad a esperar cuando el método lo realiza en unas mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de una serie de análisis realizados generalmente en un corto intervalo de tiempo (Tabla 1) (Eurachem, 1998; IQS, 1998; Huber, 1999; ICH, 1996; ENAC, 1996; ISO 5725-1, 1994; ISO 3534-1, 1993). Si la muestra se analiza por un determinado número de laboratorios con el propósito de comparar los resultados, entonces la medida de precisión a usar es la reproducibilidad (esta es la medida de precisión normalmente mayor, en teoría) (Eurachem, 1998; IQS, 1998; Huber, 1999; ICH, 1996; ENAC, 1996; ISO 5725-1, 1994; ISO 3534-1, 1993). Puede ser que una medida de precisión intermedia pueda resultar más útil en determinados casos, así se pueden fijar las condiciones en las que se desee determinar la precisión; por ejemplo, la precisión medida entre diferentes analistas, a lo largo de periodos de tiempo largos, en un único laboratorio (Tabla 1) (Eurachem, 1998; ICH, 1996).

Tabla 1. Tipos de precisión (Eurachem, 1998).

Análisis	Cálculos	Comentarios
Standards, materiales de referencia o muestras patrón adicionadas con diferentes concentraciones dentro del rango de trabajo		
a) Mismo analista, equipo, laboratorio, periodo de tiempo corto	Determinar la desviación estándar (s_1) a cada concentración	Determina la repetibilidad
b) Diferentes analistas, equipos, mismo laboratorio, periodo de tiempo largo	Determinar la desviación estándar (s_2) a cada concentración	Determina la reproducibilidad intralaboratorio
c) Diferentes analistas, equipos, laboratorios, periodo de tiempo largo	Determinar la desviación estándar (s_3) a cada concentración	Determina la reproducibilidad interlaboratorio

La precisión normalmente se mide en términos de desviación estándar (Ecuación 1) o coeficiente de variación (desviación estándar relativa) (Ecuación 2). Ambas repetibilidad y reproducibilidad dependen generalmente de la concentración de analito, y por tanto, deben determinarse a diferentes concentraciones y si la concentración influye en la precisión deberá considerarse la relación que hay entre ambas.

$$S = \left[\frac{\sum |\bar{X}_i - \bar{X}|^2}{(n-1)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$CV = \frac{S \times 100}{\bar{x}_m} \quad \text{Ecuación 2}$$

en donde \bar{X} corresponde a la media, \bar{X}_i es el valor encontrado y n el número de repeticiones realizadas. El objetivo principal en cualquier análisis es reducir al máximo esta desviación estándar, que es inversamente proporcional al tamaño de muestra (n); o, lo que es lo mismo, al número de veces que se repite el proceso.

Los coeficientes de variación máximos aceptados dependen de la concentración del analito, de los límites de aceptación del resultado y del número de repeticiones del análisis.

Según Horwitz (1982), la precisión de un método en un ensayo dentro de un mismo laboratorio puede considerarse aceptable si el coeficiente de variación (CV) obtenido es inferior al encontrado por la Ecuación 3.

$$CV = 2^{(1-0,5 \times \log C)} \quad \text{Ecuación 3}$$

en donde C es la concentración media del analito expresada en potencias de 10 (por ejemplo 1 ppm = 10^{-6}).

De igual modo, Horwitz (1982) señala que la precisión expresada como CV_{exp} , en un ensayo dentro de un mismo laboratorio, como sucede en este caso, puede considerarse aceptable si el CV encontrado es inferior a $\frac{1}{2}$ del CV encontrado al aplicar la ecuación anterior, o si se encuentra dentro del intervalo de $\frac{1}{2}$ y $\frac{2}{3}$ de dicho coeficiente.

Las fuentes de error, en caso de que el CV_{exp} no sea inferior a $\frac{1}{2}$ del CV encontrado ni se encuentre en el intervalo de Horwitz, pueden provenir de los analistas, de los instrumentos, de los reactivos, del tiempo y del entorno.

Exactitud (Recuperación).

Es el parámetro que expresa el grado de concordancia entre el valor hallado y el valor que se acepta como valor verdadero convencional o como valor de referencia (IQS, 1998; Huber, 1999).

El valor verdadero para la evaluación de la exactitud puede obtenerse de diferentes formas. Una alternativa es comparar los resultados del método con los resultados de un método de referencia establecido. En este planteamiento, debe conocerse la variabilidad del método, que es un parámetro difícil de establecer con seguridad. La exactitud también se puede evaluar mediante el análisis de una muestra de concentraciones conocidas y comparando el valor medido con el valor verdadero suministrado con el material de referencia. Si es difícil la obtención de materiales de referencia certificados o patrones, se puede evaluar la exactitud mediante el método de adiciones que consiste en añadir una cantidad conocida de patrón a la muestra y comparar la diferencia entre los resultados que se obtiene de la muestra sin adicionar y la muestra adicionada (Huber, 1999; ENAC, 1996; Eurachem, 1998).

La exactitud expresa la capacidad del método analítico para dar resultados lo más cercanos posible al valor verdadero. Matemáticamente, la exactitud se expresa en forma de diferencia entre el valor encontrado y el valor verdadero o bien como porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, como puede verse en las ecuaciones 4 y 5 (Hernández, 1992 y 1996).

$$E = |v_e - v_v| \quad \text{Ecuación 4}$$

en donde E es la exactitud; v_e , el valor encontrado y v_v , el valor verdadero.

$$E = \%R = \frac{M}{A} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

en donde E es la exactitud; R, la recuperación; M, la cantidad de analito presente en la muestra tras la adición y A, la cantidad adicionada.

El procedimiento habitual para calcular la exactitud de un método analítico, expresada en porcentaje de recuperación, es analizar bajo las mismas condiciones, una determinada muestra y la misma adicionada de una cantidad conocida del analito a estudiar (IQS, 1998).

Siempre se ha de tener en cuenta que una parte del analito puede quedar retenida y no ser detectable, con lo cual hay una pérdida respecto a la cantidad inicial incorporada, hecho que supone una falta de precisión en el resultado final, que no es nada recomendable. Por lo tanto, una validación también ha de incluir el posible ratio de elemento que se está valorando que no se detectará, en tanto que la recuperación de éste se acerque lo más posible al 100 % ideal, hecho que supondría una ganancia en cuanto a la precisión en el resultado final (IQS, 1998).

Sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación

La *sensibilidad* expresa la capacidad que tiene un método analítico para registrar ligeras variaciones de la concentración del analito.

Se pueden diferenciar dos formas de sensibilidad:

- Sensibilidad del calibrado*, que es igual a la pendiente de la recta de calibrado.
- Sensibilidad analítica*, que es la sensibilidad del calibrado dividida por la desviación estándar de la muestra.

Así, dos técnicas pueden tener la misma sensibilidad de calibrado, pero la técnica que tenga mayor precisión tendrá una mayor sensibilidad analítica (IQS, 1998).

El *límite de detección* es la menor concentración o cantidad de analito detectable con certeza razonable para un procedimiento analítico dado. Podríamos decir que es la cantidad o concentración mínima de analito a partir de la cual es factible realizar el análisis, o sea, la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto, bajo las condiciones experimentales establecidas (IUPAC (Long y Winefordner, 1983); USP XXIII (AEFI, 1989))

El *límite de cuantificación o determinación* es, según la USP XXIII (AEFI, 1989), la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

La diferencia entre ambos límites radica en que el límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad mensurable) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable). Numéricamente, es más grande el límite de cuantificación y representa la menor cantidad de analito que puede analizarse con una precisión aceptable. Concentraciones menores pueden detectarse pero no cuantificarse con seguridad.

Para calcular ambos límites se han descrito diferentes métodos, en función de criterios que se ajustan más o menos a la disponibilidad de datos con la que se cuenta en el método a validar. La ICH (1996) propone diversos métodos:

- Basados en la evaluación visual: los límites se determinan mediante el análisis de concentraciones de analito conocidas estableciendo el nivel mínimo en el que el analito puede detectarse o cuantificarse con confianza.

-Basados en el ruido de fondo: este método sólo puede aplicarse en procedimientos analíticos que tengan un ruido de fondo. La determinación se basa en comparar las señales de las muestras con bajas concentraciones de analito conocidas con la señal del blanco y estableciendo la concentración mínima en la que el analito puede ser detectado o cuantificado con confianza. Una relación entre la señal y el ruido de fondo de 3:1 o 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección; mientras que debe ser de 10:1 para ser capaz de cuantificar con confianza.

-Basados en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente: el límite de detección y de cuantificación pueden expresarse según la ecuación 6 y 7, respectivamente.

$$LD = \frac{K * S_{bl}}{b} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$LC = \frac{K * S_{bl}}{b} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde b es la pendiente de la recta de calibrado que se puede obtener de la curva de calibración del analito y S_{bl} es la desviación estándar de la respuesta, que se puede obtener de diferentes formas, entre las que cabe destacar la basada en la desviación estándar del blanco y la basada en la curva de calibrado. En la primera, la desviación estándar se obtiene después de analizar un determinado número de muestras del blanco y en la segunda, puede considerarse como desviación estándar la desviación estándar residual de la recta de regresión o la desviación estándar de la ordenada en origen de la recta de regresión.

Rango/Intervalo de trabajo

Para cualquier método cuantitativo, se requiere determinar el rango de concentraciones en que el método podrá ser utilizado. En el límite inferior del rango de concentraciones los factores limitantes son los límites de detección y/o cuantificación. El límite superior del rango de concentraciones se impone por varios factores que dependen del instrumento (Eurachem, 1998). El intervalo de trabajo normalmente deriva de los estudios de linealidad y depende de la aplicación del procedimiento. El rango se establece confirmando que el método analítico da un grado de linealidad aceptable, y de exactitud y precisión cuando se aplica a muestras que contienen cantidad de analito dentro del rango especificado para el procedimiento (ICH, 1996; ENAC, 1996).

BIBLIOGRAFÍA

AEFI (Asociación de farmacéuticos de la industria). 1989. Validación de métodos analíticos. Monografía de la AEFI-Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad.

- ENAC. 1994. G-CSQ-01. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos químicos.
- ENAC. 1996. G-CSQ-02. Guía para los laboratorios que realizan validaciones de métodos de análisis químicos.
- EURACHEM/WELAC. 1993. Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of Standard and ISO/IEC Guide 25. EURACHEM Secretariat, Teddington, Middlesex.
- EURACHEM. 1998. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. EURACHEM Secretariat, Teddington, Middlesex.
- Hernández, T. 1992. Desenvolupament i aplicació d'un mètode per CLAE per a la determinació d'amines biògenes en peix i derivats. Tesi de Llicenciatura. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.
- Hernández, T. 1996. Estudi de l'origen de les amines biògenes en derivats càrnics. Tesi doctoral. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.
- Horwitz, W. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* 54:67-76.
- Huber, L. 1999. Validation and qualification in analytical laboratories. Interpharm Press cop., Buffalo Grove (ILL.).
- ICH Expert working group. 1996. Validation of analytical procedures: methodology. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Génova.
- IQS. 1998. Validación de métodos de análisis cromatográficos. Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull.
- ISO/IEC Guide 25. 1990. General requirements for the competence of calibration and testing laboratories.
- ISO 8402:1994 Quality vocabulary, Ginebra.
- ISO 3534-1:1993. Statistics-vocabulary and symbols-Part 1: Probability and general statistics terms.
- ISO 5725:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 1: General principles and definitions.
- Long, G. L., and J. D. Winefordner. 1983. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55(7): 712-724.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la viabilidad de inactivar dos enzimas, una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y una proteasa de *Bacillus subtilis*, inoculados en leche o en solución modelo de ultrafiltrado de leche (SMUL) y además evaluar el efecto de los tratamientos mediante pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC) en el contenido en vitaminas hidró y liposolubles. Para la consecución del mismo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Validación de los métodos analíticos para determinar la actividad lipásica y proteásica y cuantificar las vitaminas tanto en SMUL como en leche.
- Estudio del efecto de las variables tiempo de tratamiento (anchura de pulso y número de pulsos), intensidad de campo, densidad de energía, frecuencia de aplicación de los pulsos y medio de tratamiento en el nivel de reducción de la actividad de los enzimas y del contenido en vitaminas.
- Comparación de la efectividad de los tratamientos térmicos y PEAIC en la inactivación de ambos enzimas y en la destrucción de vitaminas.
- Determinación de los tratamientos y condiciones de aplicación de PEAIC adecuados para alcanzar niveles elevados de inactivación de los enzimas sin alterar significativamente el contenido en vitaminas.
- Evaluación de diversos modelos matemáticos que describan con suficiente exactitud la relación entre densidad de energía, tiempo de tratamiento (o número de pulsos) y/o la intensidad de campo con los efectos de los PEAIC sobre las actividades enzimáticas y el contenido en vitaminas.

PUBLICACIONES

Capítulo 1

Validation and comparison of analytical methods based on the release of p-nitrophenol to determine lipase activity in milk

S. Bendicho, M. C. Trigueros, T. Hernández, and O. Martín

Journal of Dairy Science (2001) 84, 1590-1596.

ABSTRACT

Three methods for the determination of lipase activity were optimized, validated and compared using skim and whole milk. A chromogenic ester (p-nitrophenyl caprilate) was used in all of them to quantify the enzyme activity through the release of p-nitrophenol. It was measured colorimetrically (method A) or spectrophotometrically (methods B and C) using a clarifying reagent to render the samples measurable. What made methods B and C different was the use of an inhibiting mixture in the latter one, to better stop the enzymatic reaction.

Reliability was satisfactory in all the methods. They were linear in the range of 0 to 300 mU/ml of the enzyme and the least detection and quantification limits were 9.31 and 31.03 mU/ml of lipase, respectively. The precision, measured as relative standard deviation, was between 1.52 and 4.94% and mean recoveries ranged between 81 and 90%.

Linearity, sensitivity and accuracy were significantly different among the methods. Methods B and C had better linearity and sensitivity than method A and the best results on accuracy were obtained when performing methods A and B in skim milk. Sensitivity was influenced by the fat content of the samples. On the other hand, the content of lipase did not influence the reliability of any method.

Although, all of the methods are useful for routine analysis in quality control of milk, the best reliability was achieved when using method B. Moreover, it would be the method of choice because it is easier and less costly to perform than the other methods.

Key words: lipase activity, p-nitrophenol, validation, comparison of methods

INTRODUCTION

Raw milk and even processed milk, may suffer deterioration because of the effect of some enzymes such as lipases (Driessen, 1983). The activity of these enzymes in milk and dairy products involves the hydrolysis of triacylglycerides that causes rancid and soapy flavors due to the build up of fatty acids and other derivative products (Luquet, 1991).

Usually, milk is stored cooled before processing, that favors the growing of psychrotrophic bacteria. That microflora is typically dominated by *Pseudomonas* species (mainly *Pseudomonas fluorescens*), which account for approximately 50 to 75% of the Gram-negative organisms in milk (Blake et al., 1996). *Pseudomonas* produce extracellular lipases that may remain active after the usual thermal treatments applied in the manufacture of dairy products (Driessen, 1983). Very low amounts of lipase can produce functional and sensory defects during storage and also after processing milk (Deeth et al., 1983; San José et al., 1983). So, a fast and sensitive method is required to detect little concentrations of these enzymes in routine analysis.

Various procedures have been developed to determine the residual activity of lipases in milk; however, those assays tend to be unsuited for widespread commercial use because of their slowness and limited sensitivity (Blake et al., 1996). There are some methods based on the extraction and titration of fatty acids (Adams et al., 1981; Deeth et al., 1983). A conductimetric method, based on the acidification of milk, was described by Ballot et al. (1984) and also a diffusion method using an agar medium with tributyrin as substrate was described by Christen and Marshall (1984). Other procedures that require expensive systems or sophisticated techniques were developed, as the one described by Jensen (1983) that used radioactive components; Walde and Luisi (1989) reported a IR spectroscopy method; Veeraragaban et al. (1990) and Maurich et al. (1991) described an HPLC method and O'Connor et al. (1992) used an NMR technique.

Reflectance colorimetry using tributyrin may be used to measure the lipase activity (Richardson et al., 1989), but the detection limit is too high to be used in products containing low concentrations of the enzyme. Dias and Weimer (1995) introduced the use of chromogenic substrates and reflectance colorimetry in milk to determine enzymatic activity. They suggested that this technique might be useful for a better estimation of lipase activity in dairy products. Afterwards, Blake et al. (1996) used colorimetry to measure lipase activity monitoring the hydrolysis of a chromogenic ester (p-nitrophenylcaprylate).

Spectrophotometric and fluorometric methods require tedious sample preparations due to the opacity of milk and dairy products (Mckellar et al., 1986; Jacks et al., 1967; Stead, 1983). However, Humbert et al. (1997) described a simple spectrophotometric method to measure lipase activity in milk samples using p-nitrophenyl butyrate as substrate after eliminating the turbidity with a product called Clarifying Reagent[®] (1987). This reagent renders soluble casein micelles and fat globules and allows direct spectrophotometric measurements without separation and extraction steps.

The use of chromogenic phenolic esters, as described by Blake et al. (1996) and Humbert et al. (1997), seemed to be simple and fast for determining residual lipase activity in milk, moreover only basic apparatus was required.

Therefore, a reflectance method based on Blake et al. (1996) and two spectrophotometric methods based on Humbert et al. (1997) were developed and optimized for determining the activity of a commercial lipase of *P. fluorescens* in skim and whole milk in the range 0 - 300 mU/ml of the enzyme. The activity was measured by monitoring the hydrolysis of p-nitrophenyl caprylate (p-NPC) that releases the yellow chromogen, p-

nitrophenol. Thus, the objectives of this study were to validate and compare the three optimized methods and also to evaluate the effect of the fat content of milk and the enzyme concentration in the sensitivity, accuracy and precision of the measurements.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Skim milk (SM) and whole milk (WM) treated by ultra high temperature (UHT) were supplied by 'Granja Castelló, S.A.' (Mollerussa, Spain). The absence of lipase activity in the samples was verified in order to avoid problems in the validation process.

Lipase (42 U/mg) from *Pseudomonas fluorescens* [9001-62-1], was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). The activity was expressed in mU/ml after verifying that there is a linear correlation between lipase activity in mU/ml (from commercial information) and lipase concentration in mg/ml using the evaluated methods.

p-nitrophenyl caprylate, hydrochloric acid (1 M), phenylmethanesulphonyl fluoride, dimethylformamide, and sodium azide were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Clarifying reagent[®], sodium hydroxide (1 N) and tris(hydroxymethyl) aminomethane were provided by Prolabo (Fontenay S/Bois, France). Dimethylsulfoxide, acetone and ethylenediaminetetracetic acid (disodium salt) were from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

Solutions

Firstly, a stock solution of 1000 mU of lipase per ml was prepared by diluting the powdered enzyme in distilled water.

Milk samples with 0, 50, 100, 125, 150, 200, 275 to 300 mU/ml of lipase in SM or WM were prepared using the stock solution.

Prior to running the analysis, a p-NPC solution (0.005 M) was prepared by adding 1326.50 mg of p-NPC to 1000 ml of dimethylsulfoxide. A pH 8.5 buffer was prepared by mixing 250 ml of tris(hydroxymethyl) aminomethane (0.2 M) with 173 ml of hydrochloric acid (0.1 M) and diluting with distilled water to 1000 ml.

An inhibiting mixture was obtained by mixing three volumes of 0.06 M ethylenediaminetetracetic acid (disodium salt) (adjusted to pH 7.6 with NaOH) with 1 volume of 0.06 M phenylmethanesulphonyl fluoride diluted in dimethylformamide.

Apparatus

- Spectrophotometer: UV/Visible CECIL, CE 1021, England
- Colorimeter: Macbeth Color-Eye 3000, New Burg, New York, USA.
- Thermostatic bath: Clifton-NE4D (14 liters), Weston-Super-Mare, England

Assayed Methods for lipase activity estimation

Three methods that use p-NPC as substrate were modified. In all the cases, blanks were prepared with milk without lipase and using the same conditions of assay.

Method A (modified Blake et al. (1996) method)

The analysis was started by placing 1 ml of the p-NPC solution and 20 ml of pH 8.5 buffer in each of the test tubes. Then, the reaction was started by the addition of 1 ml of the milk sample (containing the enzyme) in each one. After stirring, the tubes were incubated for 1 hour at 37 °C. Next, the b* color value (blue to yellow) was measured colorimetrically.

Method B (firstly modified Humbert et al. (1997) method)

To run the analysis, 100 µl of p-NPC solution, 2 ml of pH 8.5 buffer and 500 µl of SM plus enzyme or 400 µl of WM samples plus enzyme, were placed in a test tube. This mixture was incubated at 37 °C for 30 min for SM or 45 min for WM. Finally, 1 ml Clarifying Reagent[®] was added to each tube. After stirring they were incubated at 37° C for 3 min and the mixture was transferred into cuvettes to read the absorbance at 412 nm.

Method C (secondly modified Humbert et al. (1997) method)

The procedure used in this method was similar that of Method B. The only difference was that 3 minutes before the addition of the Clarifying Reagent[®], 400 µl of the inhibiting mixture were dropped to each test tube.

Validation and comparison of the analytical methods

The analytical characteristics of the tested methods in WM or SM were validated to ensure the suitability of the analytical requirements and the reliability of the results. Afterwards, the three methods were compared. The statistical treatments were performed with the Statgraphics plus Version 2.1. for Windows, statistical software (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA, 1994-1996).

Validation

The three considered methods were validated through their linearity, sensitivity, precision and accuracy.

Linearity

The relation between the concentration of lipase (dependent variable) and the b* parameter in method A or the absorbance at 412 nm in methods B and C (independent variable) defined linearity.

After verifying the normal distribution of the results, linearity was evaluated in milk with different fat content (SM or WM) by the analysis of variance of the regression equation. The experimental Fisher value (F_{exp}) was compared to its tabulated value (F_{tab}) for 1 and n-2 degrees of freedom (Steel et al., 1980). If F_{exp} was higher than F_{tab} the existence of a linear relationship between both variables ($P < 0.001$) was accepted.

The correlation coefficient (r) was calculated by means of least-squares analysis, after three repetitions of seven different concentrations (0, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mU/ml) for each method and fat content of milk. r -value indicated the relatively strong relationship between the variables.

Afterwards, the determination coefficient (r^2) was determined to know the extent of the total variability of the response that could be explained by the lineal regression model.

Sensitivity

The detection limit (**DL**) and quantification limit (**QL**) were calculated from the calibration lines that defined linearity, using the Long and Wineforder criterion (Long et al., 1983). The values of the slope of the calibration lines (b) and the standard error of the independent term of the regression (S_{b1}) were required. They were calculated according to the equations 1 and 2.

$$DL = \frac{3 \times S_{b1}}{b} \quad \text{Equation 1}$$

$$QL = \frac{10 \times S_{b1}}{b} \quad \text{Equation 2}$$

Precision

The precision of the method indicated the degree of dispersion obtained with a series of determinations on the same sample.

Six measurements were performed for each one of the examined methods in SM or WM containing 125 mU/ml of the enzyme. The standard deviation and the relative standard deviation (RSD) were calculated, and the adequacy of the RSD to the Horwitz criterion (Horwitz, 1982) was evaluated. To consider RSD acceptable in terms of precision, the experimental values (RSD_{exp}) should be lower than the RSD calculated throughout the Horwitz formula (equation [3]), where C is the average concentration of the analite.

$$RSD = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad \text{Equation 3}$$

Accuracy

This parameter showed the proximity between the experimental values and the real ones. It ensured that no loss or uptake occurred during the process. The determination of this parameter was performed for each method on SM or WM by studying the recovery after standard addition procedure using two addition levels. The initial content of the samples was "none detectable" and after the addition, concentrations of 75 and 275 mU lipase/ml were reached. Six determinations were carried out for each addition level and the % of recovery was calculated.

The homogeneity of variances of the measurements for each assayed level was verified by a Cochran test (Steel et al., 1980).

The mean recoveries of each level were compared using a Student's t -test. It was carried out by comparing the experimental t -value (t_{exp}) to the tabulated one (t_{tab}) for $(n-1)$ degrees

of freedom (Steel et al, 1980) Therefore, an average value of both levels could be considered when t_{exp} was lower than t_{tab}

Comparison of the methods

To compare the methods in terms of linearity, sensitivity and recovery, firstly a variance analysis was performed to study the influence of the different factors on each evaluated parameter Afterwards, a multiple comparison procedure determined which means were significantly different from which others The method currently used to discriminate among the means was Fisher's least significant difference (LSD) procedure ($P < 0.05$) Results of linearity were compared using three calibration lines with their respective r -value DL and QL were used to compare the sensitivity of each method Finally, to carry out the comparison test on the accuracy, all the values of recovery of each set of analysis were considered

RESULTS AND DISCUSSION

Linearity

Reflectance (method A) and absorbance (methods B and C) responses to the enzymatic activity of 0 to 300 mU/ml of lipase were linear (Table 1) Least-squares analysis lead to correlation coefficients $r > 0.974$ in all the cases ($P < 0.001$) (Table 1) The coefficients of determination (r^2) were higher than 94.8% for method A and than 97.4% for methods B and C (Table 1)

Table 1 Linearity parameters of the calibration lines to determine lipase activity in skim milk (SM) or whole milk (WM) using three analytical methods

Method ⁽¹⁾	Kind of milk	Calibration line	r	r^2	F_{exp} ⁽²⁾
A ^a	SM	$y = 0.009x + 7.44$	0.980	0.960	456.40
	WM	$y = 0.041x + 5.8$	0.974	0.948	351.20
B ^b	SM	$y = 0.004x + 1.10$	0.997	0.993	2761.26
	WM	$y = 0.002x + 0.60$	0.987	0.974	700.44
C ^b	SM	$y = 0.003x + 0.453$	0.997	0.994	3422.95
	WM	$y = 0.0009x + 0.252$	0.992	0.985	1231.31

⁽¹⁾A colorimetric method, B spectrophotometric method, C spectrophotometric method using inhibiting mixture

⁽²⁾Statistic F-Fisher calculated experimentally ($F_{tab(1, 19, 0.001)} = 15.08$)

^{a,b}Methods with different superscript differ in r -value ($P < 0.05$)

The correlation coefficients of the calibration lines were determined to compare the goodness of the linearity. No differences were observed on the r obtained using milk with different fat content ($P < 0.05$) (Table 1). But the results in terms of linearity goodness were significantly different ($P < 0.05$) depending on the analytical method. The degree of linear relationship between both variables for spectrophotometric methods (B and C) was similar, and better than that obtained using the colorimetric one (A) (Table 1).

Sensitivity

The values of DL and QL are shown in Table 2 where it can be observed that both limits were lower when using the spectrophotometric methods (B and C). With methods B and C, DL and QL had maximal values of 20.40 and 68.00 mU/ml, respectively. Whereas maximal values for method A were 28.83 and 96.10 mU/ml, respectively.

A comparison among the results of sensitivity was carried out and it was observed that both DL and QL depended significantly on the kind of milk and on the analytical method applied. In both parameters, DL and QL, methods B and C held better results than method A. Therefore, spectrophotometric methods had higher sensitivity in terms of detection and quantification (table 2).

Performing each analytical method using different kinds of milk lead to different results in every case (Figure 1). Methods A and C gave similar results in DL and QL when using SM or WM, but method B held lower DL and QL when determinations were carried out in SM. On the other hand, it can be observed that method A always presented higher values of DL and QL (Figure 1). So, method A is less sensitive than methods B and C.

Table 2. Detection and quantification limits calculated using the Long and Winefordner criterion (1983) for the evaluated methods to determine lipase activity in skim milk (SM) or whole milk (WM).

Method ⁽¹⁾	Kind of milk	Slope ⁽²⁾	Standard Error ⁽³⁾	Detection limit (mU/ml)	Quantification limit (mU/ml)
A ^a	SM	0.0087	0.07	25.17	83.91
	WM	0.041	0.4	28.83	96.10
B ^b	SM	0.00413	0.014	10.17	33.90
	WM	0.0025	0.017	20.40	68.00
C ^b	SM	0.0029	0.009	9.31	31.03
	WM	0.00089	0.005	16.85	56.18

⁽¹⁾A colorimetric method, B spectrophotometric method, C spectrophotometric with inhibitors method

⁽²⁾Slope of the calibration line

⁽³⁾Standard error of the intercept point of the calibration line

^{a,b}Methods with different superscript differ in detection and quantification limits ($P < 0.05$)

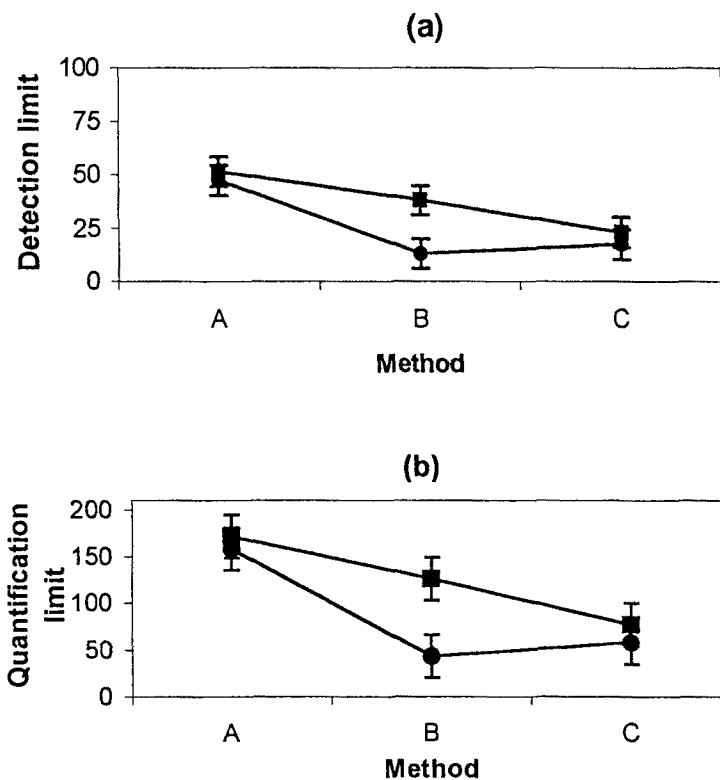


Figure 1. Significant interactions between the analytical method performed and the kind of milk that affect on the detection (a) and quantification limits (b). Analytical methods: A, colorimetric method; B, spectrophotometric method; C, spectrophotometric method using inhibiting mixture. Kind of milk: (●) skim milk, (■) whole milk.

Precision

Table 3 shows that relative standard deviations (RSD) of less than 5% were obtained in all the cases and that each was satisfactory according to the Horwitz criterion (Horwitz, 1982).

Table 3. Precision of the assay methods for the determination of lipase activity in skim milk (SM) and whole milk (WM).

Method ⁽¹⁾	Kind of milk	$\bar{X} \pm \sigma$ ⁽²⁾	RSD (%)	RSD Horwitz ⁽³⁾
A	SM	133 ± 5	4.12	13.46
	WM	148.5 ± 2.2	1.52	13.26
B	SM	96 ± 5	4.94	14.26
	WM	101 ± 3	3.21	13.68
C	SM	90 ± 4	4.46	14.12
	WM	119 ± 6	4.94	14.02

⁽¹⁾A: colorimetric method, B: spectrophotometric method, C: spectrophotometric method with inhibitors

⁽²⁾Mean ± standard deviation in mU/ml

⁽³⁾Acceptable RSD value based on the HORWITZ criterium

Accuracy

The homogeneity of variances of the recovery was verified through a Cochran test (Table 4). The Student test showed that the recovery of lipase did not depend on the enzyme concentration except for WM using method A (Table 4). Therefore, the final recovery was the average of the results obtained in both levels of addition for each method and kind of milk, except for the method A using WM (Table 4).

Method A was the one that better recovered the enzymatic activity ($P < 0.05$). But the only method that lead a recovery similar to theoretical 100% was method B with skim milk (Table 4)

There were interactions among all the factors studied (analytical method, fat content and lipase concentration) ($P < 0.05$) (Figure 2). The best recoveries for method A were obtained using whole milk and in the lower level of addition (Figures 2a and 2b). On the contrary, method B obtained the greatest recoveries from skim milk, but at the highest concentration of lipase (Figures 2a and 2b). The recoveries of method C depended only on the fat content of the milk, skim milk being the one where the best recovery was observed (Figure 2a and 2b). When considering samples of milk with different lipase concentration, it was observed that the recovery obtained in samples of SM and WM with 75 mU/ml of lipase were similar, whereas SM presented much better recovery than WM when the lipase content of the samples was 275 mU/ml (Figure 2c) Thus, better recovery was obtained at higher concentrations of lipase and in SM.

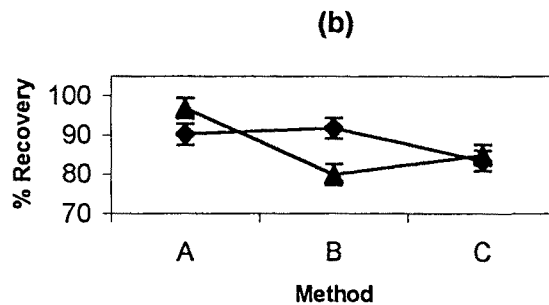
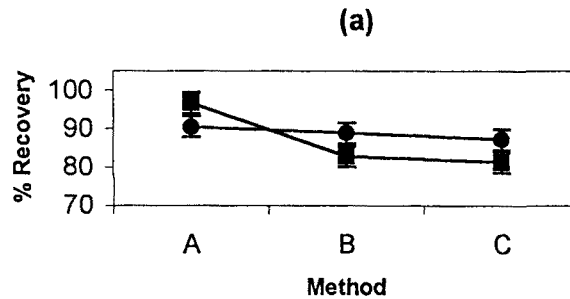
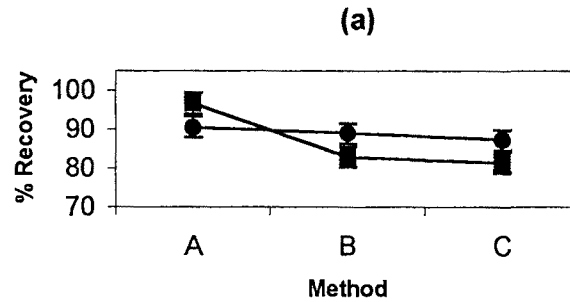


Figure 2. Interactions between the different factors that affect on the recovery results: a) analytical method and kind of milk; b) analytical method and concentration of lipase; c) lipase concentration and kind of milk.

Analytical methods: A, colorimetric method; B, spectrophotometric method; C, spectrophotometric method using inhibiting mixture.

Kind of milk: (●) skim milk, (■) whole milk.

Concentration of lipase: (▲) 75 mU/ml, (◆) 275 mU/ml.

Table 4. Accuracy of different methods to determine lipase activity in skim milk (SM) or whole milk (WM)

Method ¹	Sample	Recovery (%)		Cochran test ²	L-Student test ³	Mean Recovery	100-Student test ⁴
		Level I (75 mU/ml)	Level II (275 mU/ml)				
A ^a	SM	90 ± 6	91 ± 4	0.850	0.485	90	6.304
	WM	104 ± 3	89.2 ± 2.2	0.822	9.330	---	---
B ^b	SM	82 ± 6	96 ± 6	0.510	4.465	89	4.097
	WM	78 ± 6	87 ± 5	0.687	2.814	83	8.517
C ^b	SM	86 ± 4	88 ± 3	0.679	0.781	87	12.377
	WM	84 ± 4	79 ± 3	0.769	1.984	81	14.503

¹A colorimetric method, B spectrophotometric method, C spectrophotometric with inhibitors method

²Cochran's test, $C_{tab}(2, 5, 0.05) = 0.877$

³Test to determine differences on the recoveries obtained in level I and II, $t_{tab}(3, 0.001) = 6.869$

⁴Test to determine differences among the mean recovery obtained and the theoretical 100%, $t_{tab}(11, 0.001) = 4.437$

^{a,b}Methods with different superscript differ in recoveries ($P < 0.05$)

CONCLUSIONS

All the studied methods were significantly linear in the range of 0 to 300 mU/ml. Sensitivity was studied throughout the parameters DL and QL and the least values were, respectively, 9.31 and 31.03 mU/ml. These values are sensitive enough to determine lipase activity in natural milk. In terms of precision, all the methods fulfilled the Horwitz criterion. So, all of them may be considered precise. The accuracy was studied through the recovery of two levels of addition. The results did not depend on the lipase content of the samples except for the colorimetric method with whole milk.

Spectrophotometric methods (B and C) had better linearity and sensitivity than the colorimetric one, showing the lowest DL and QL in skim milk. Accuracy of spectrophotometric methods were similar and better than the obtained using the colorimetric procedure with whole milk, while when measuring the lipase activity in skim milk the best accuracy was for the colorimetric method. Spectrophotometric methods showed similar results in the statistical studied terms and showed better results in most of the evaluated parameters than the colorimetric assay. Moreover, spectrophotometric methods let the detection of smaller enzyme concentrations, and consequently, they are more suitable. However, the spectrophotometric method that use an inhibiting mixture to stop the enzymatic reaction (method C) showed lower recoveries than the other one (method B). Then, the use of that mixture does not improve the results, and moreover, it

makes the procedure more tedious and expensive. So method B may be chosen for routine analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of Spain for its support of the work included in the project ALI97 0774, and to Granja Castelló S.A. (Mollerussa, Lleida, Spain) for supplying the milk.

REFERENCES

- Adams, D., and T. Brawley. 1981. Heat resistant bacterial lipases and ultra-high temperature sterilization of dairy products. *J. Dairy Sci.* 64:1951-1957.
- Ballot, C., G. Favre-Bonvin, and J. M. Wallach. 1984. Lipase assay in duodenal juice using a conductimetric method. *Clin. Chem. Acta* 143:109-114.
- Blake, M. R., R. Koka and B. C. Weimer. 1996. A semiautomated reflectance colorimetric method for the determination of lipase activity in milk. *J. Dairy Sci.* 79: 1164-1171.
- Christen, G., and R. Marshall. 1984. Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.* 67:1680-1693.
- Deeth, H. C. and C. H. Fitz-gerald. 1983. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. Pages 195-239 *in* Developments in dairy chemistry. Vol. 2. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York.
- Dias, B. and B. Weimer. 1995. A semi-automated colorimetric method for determination of amino peptidase activity in turbid solutions. *J. Rapid Meth. Automation Microbiol.* 3: 223-235.
- Driessen, F. M. 1983. Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation, and their importance for the keeping quality of milk products. Ph. D. Diss., Agricultural University Wageningen, Netherlands.
- Horwitz, W. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* 54:67-76.
- Humbert, G., M. F. Guincamp and G. Linden. 1997. Method for the measurement of lipase activity in milk. *J. Dairy Res.* 64:465-469.
- Jacks, T. J. and H. W. Kircher. 1967. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Anal. Biochem.* 21:279-285.
- Jensen, R. G. 1983. Lipolysis. *J. Dairy Sci.* 47:210-214.
- Linden, G., G. Humbert, R. Kouomegne, and M. F. Guincamp. 1987. Reagent for rendering biological fluids transparent and its analytical applications. European Patent Application EP 0 246 978 B1.
- Long, G. L., and J. D. Winefordner. 1983. Limit of detection. A closer look at the iupac definition. *Anal. Chem.* 55(7): 712-724.
- Luquet, M. 1991. Leche y productos lácteos. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Maurich, V., M. Zacchigna, and A. Pittoti. 1991. P-nitrophenyllaurate: a substrate for the high-performance liquid chromatographic determination of lipase activity. *J. Chromatogr.* 566: 453-459.

- Mckellar, R. C., and H. Cholette. 1986. Determination of the extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* species in skim milk with the β -naphthyl caprylate assay. *J. Dairy Sci.* 53:301-312.
- O'Connor, C. J., S. F. Petricevic, J. M. Coddington, and R. A. Stanley. 1992. An NMR assay for quantitating lipase activity in biphasic macroemulsions. *J. A. O. C. S.* 69:295-300.
- Richardson, A.C., B. V. Smith, R. G. Price, and P.F. Praill. 1989. Chromogenic substituted arylolethene derivatives as substrates for hydrolytic enzyme assays. European patent WO 89-02473.
- San José, C., and M. Juárez. 1983. Lipólisis en leche y productos lácteos. Métodos de control. *Alimentación equipos y tecnología*, 4:33-42.
- Stead, D. 1983. A fluorimetric method for the determination of *Pseudomonas fluorescens* AR11 lipase in milk. *J. Dairy Res.* 50:491-502.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. McGraw Hill Book Co, New York, NY.
- Veeragavan, K. 1990. A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Anal. Biochem.* 186:301-305.
- Walde P., and Luisi P. L. 1989. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochem.* 28 (8): 3353-3360.

Capítulo 2

Determination of Proteolytic Activity in Different Milk Systems

S. Bendicho, G. Martí, T. Hernández, and O. Martín

Food Chemistry (in press)

ABSTRACT

A method for the determination of proteolytic activity in whole milk, skim milk or in a solution similar to skim milk ultrafiltrate was optimized and validated. An artificial substrate (azocasein) was used to quantify the enzyme activity through the release of a chromogenic product that was measured spectrophotometrically after clarifying the samples by the addition of trichloroacetic acid.

The method resulted linear in the range of 0 to 50 mU/ml of added *Bacillus subtilis* protease and the least detection and quantification limits were 2.29 and 7.64 mU/ml of protease, respectively. The precision, measured as relative standard deviation, was between 1.14 and 7.99% and mean recoveries ranged between 99 and 104%. Reliability of the method was satisfactory for all products evaluated.

Keywords: protease activity, milk, azocasein, validation

INTRODUCTION

Proteases are enzymes that degrade proteins. Raw milk may have proteolytic activity from endogenous or indigenous origin. Wherever they come from, proteases can cause unpleasant flavors and odors in milk (Fox, 1981; Veisseyre, 1988).

Several bacteria present in raw milk can produce proteases (Fox, 1981; Veisseyre, 1988). Among them, those from psychrotrophic microorganisms, what produce enzymes when refrigerated, cause most the serious problems (Law, 1979; Cousin, 1982). *Bacillus subtilis* is a psychrotrophic microorganism (Kohlmann, Nielsen, Steenson & Ladisch, 1991) and secretes a thermo-resistant protease (Poffé & Mertens, 1988) which may cause proteolysis even in pasteurized or sterilized milk (Law, Andrews & Sharpe, 1977).

Diminution of thermal stability is a technological consequence of the presence of bacterial proteases in milk. On the other hand, these enzymes cause degradation of caseins which implies losses in the yield of cheese and an increase of the nitrogen content in the whey (Gebre-Egziabher, Humbert & Blankenagel, 1980; Veisseyre, 1988).

Several colorimetric methods have been described to detect and quantify protease activity (Rollema et al., 1989). Some of them measure the degradation of natural milk substrates due to the action of the proteolytic enzymes through the determination of the concentration of acid-soluble amino acids and peptides. The methods described by Hull (1947), Lowry, Rosebrough, Farr and Randall (1951), and the known as the tyrosine index (Juffs, 1973), quantify the acid-soluble protein fragments in the samples using the Folin reagent. Other methods are based on the measurement of amino groups freed during the hydrolysis of peptide bonds, such as use ninhydrine (Moore & Stein, 1954) or trinitrobenzene acid (Fields, 1972), compounds that react with primary amino groups to give measurable colored products. However, there are other kind of assays that specifically and directly measure the proteolytic activity of the samples by means of the addition of an artificial substrate that, when hydrolyzed, release colored products. Azocasein (Charney & Tomarelli, 1947; Christen & Marshall, 1984) is one of the best known substrates. Moreover, it has been used to relate the growth of two microorganisms *Pseudomonas fluorescens* M3/6 and *Pseudomonas fragi* K122 to the increase in the proteolytic activity of milk samples (Kohlmann et al., 1991).

It should be interesting to have a validated method for measuring the proteolytic activity in different media. In this study, proteolytic activity was quantified by a colorimetric method using azocasein as artificial substrate in three different media: a model solution similar to milk ultrafiltrate (a fat and protein free solution), skim milk (fat free) and whole milk. The method was evaluated in terms of linearity, sensitivity, precision and accuracy. Moreover, the influence of the fat and protein content of the samples on the reliability of the method was studied.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

This study was performed in skim and whole milk, which were provided by Granja Castelló S.A. and in SMUF, the composition of which is shown in Table 1 (Jeness & Koops, 1962).

The protease from *Bacillus subtilis* was purchased in a liquid commercial form (Aldrich, Steinheim, Germany). According to the supplier's information, it contained 728 U/ml of protease activity. The enzyme activity was expressed in mU/ml after verifying that there was a linear correlation between enzyme activity in mU/ml (from commercial information) and enzyme concentration in mg/ml using the evaluated method.

Samples of whole milk (WM), skim milk (SM) or SMUF containing 10, 20, 30, 40 or 50 mU/ml were prepared to validate the method.

Table 1. Composition of simulated skim milk ultrafiltrate^a (Jeness & Koops, 1962).

Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	50.00
Potassium phosphate	KH_2PO_4	1.58
Potassium citrate	$K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	0.98
Potassium sulphate	K_2SO_4	0.18
Sodium citrate	$C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	1.79
Calcium chloride	$CaCl_2$	1.30
Magnesium citrate	$Mg_3C_{12}H_{10}O_{14} \cdot 9H_2O$	0.38
Potassium carbonate	K_2CO_3	0.3
Potassium chloride	KCl	1.00

^a The values are expressed in g/l.

Enzyme determination

Reagents

Disodium hydrogenphosphate, sodium dihydrogenphosphate and trichloroacetic acid were provided by Prolabo (Fontenay S/Bois, France) and the azocasein by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Solutions

A pH 7.2 buffer solution was prepared by mixing 36 ml of sodium hydrogenphosphate (5 mM) and 14 ml of sodium dihydrogenphosphate (5 mM) and diluting with distilled water to 1000 ml. This buffer was used to prepare a 1% azocasein solution. A 5% aqueous solution of trichloroacetic acid was also required.

Determination of protease activity

The assay for proteolytic activity used in this case is based on that described by Christen and Marshall (1984). It involved combining 1 ml of the azocasein solution with 100 μ l of the sample which contains the enzyme. The contents of the tubes were mixed and incubated

at 35.5 °C for 15 min. The reaction was stopped by the addition of 2 ml of 5% TCA. The absorbance of the supernatant was read at 345 nm in a UV/Visible spectrophotometer (CECIL, CE 1021, England).

Validation of the analytical method

The analytical characteristics of the tested method in WM, SM or SMUF were validated to ensure the reliability of the results. Afterwards, the results obtained on SMUF or milk, with or without fat, were compared. The statistical treatments were performed with the Statgraphics plus Version 2.1. for Windows, statistical software (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA, 1994-1996).

Validation

The method was validated in WM, SM and SMUF through their linearity, sensitivity, precision and accuracy.

Linearity: The relation between the concentration of protease (dependent variable) and the absorbance at 345 nm (independent variable) defined linearity. It was evaluated by the analysis of variance of the regression equation. The experimental Fisher value (F_{exp}) was compared to its tabulated value (F_{tab}) for 1 and n-2 degrees of freedom (Steel & Torrie, 1980). If F_{exp} was higher than F_{tab} the existence of a linear relationship between both variables ($P < 0.001$) was accepted.

The correlation coefficient (R) was calculated by means of least-squares analysis, after three repetitions of six different concentrations (0, 10, 20, 30, 40 and 50 mU/ml) for each method and substrate. R-value indicated the relatively strong relationship between the variables.

Afterwards, the determination coefficient (R^2) was determined to know the extent of the total variability of the response that could be explained by the linear regression model.

Sensitivity: The detection limit (DL) and quantification limit (QL) were calculated from the calibration lines that defined linearity, using the Long and Winefordner criterion (Long & Winefordner, 1983). The values of the slope of the calibration lines (b) and the standard error of the independent term of the regression (S_{b1}) were required. They were calculated according to the Equations 1 and 2.

$$DL = \frac{3 \times S_{b1}}{b} \quad \text{Equation 1}$$

$$QL = \frac{10 \times S_{b1}}{b} \quad \text{Equation 2}$$

Precision: The precision of the method indicated the degree of dispersion obtained with a series of determinations on the same sample.

Six measurements were performed for samples containing 50 mU/ml of the enzyme. The standard deviation and the relative standard deviation (RSD) were calculated, and the adequacy of the RSD to the Horwitz criterion (Horwitz, 1982) was evaluated. To consider RSD acceptable in terms of precision, the experimental values (RSD_{exp}) should be lower than the RSD calculated throughout the Horwitz formula (Equation 3), where C is the average concentration of the analyte ($mU/ml \cdot 10^{-6}$).

$$RSD = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad \text{Equation 3}$$

Accuracy: This parameter showed the proximity between the experimental and theoretical values. The determination of this parameter was performed for each milk system by studying the recovery after standard addition procedure using two addition levels. The initial proteolytic activity of the samples was “non detectable” and the study was carried out using concentrations of 10 and 50 mU protease/ml. Six determinations were carried out for each addition level and the % of recovery was calculated.

The homogeneity of variances of the measurements for each assayed level was verified by a Cochran test (Steel & Torrie, 1980).

The mean recoveries of each level were compared using a Student's t-test. It was carried out by comparing the experimental t-value (t_{exp}) to the tabulated one (t_{tab}) for (n-1) degrees of freedom (Steel & Torrie, 1980). Therefore, an average value of both levels could be considered when t_{exp} was lower than t_{tab} .

Influence of the medium on the reliability of the method.

To compare the reliability of the method when performed in different media in terms of linearity, sensitivity and recovery, first a variance analysis was performed to study the influence of the different media on each evaluated parameter. Afterwards, a comparison procedure was performed to find significant differences among the mean values obtained from the different milk media systems. The method currently used to discriminate among the means was Fisher's least significant difference (LSD) procedure ($P < 0.05$). Results of linearity were compared with three calibration lines with their respective r-value. The DL and QL were used to compare the sensitivity of the method for each media. Finally, to carry out the comparison test on the accuracy, all the values of recovery of each set of analysis were considered.

RESULTS

Linearity

Absorbance responses to the enzymatic activity of 0 to 50 mU/ml of protease in all the media were linear (Table 2). Least-squares analysis lead to correlation coefficients $r > 0.991$ for both skim and whole milk and 0.995 for SMUF ($P < 0.001$) (Table 2). The coefficients of determination (r^2) were higher than 98.2% for milk and 99.0 % for SMUF (Table 2).

Table 2. Linearity parameters of the calibration lines for the evaluated method to determine protease activity in whole (WM), skim milk (SM) and simulated milk ultrafiltrate (SMUF).

Sample	Calibration line	R	R ²	F _{exp} ^a	p ^b
WM	y = 0.0086 + 0.0917x	0.991	0.982	799.83	<0.001
SM	y = 0.015x + 0.034	0.991	0.982	861.27	<0.001
SMUF	y = 0.014x + 0.128	0.995	0.990	1602.48	<0.001

^aStatistic F-Fisher calculated experimentally, F_{tab(1,16,0.001)} = 16.12

^bSignificance level

Sensitivity

The values of DL and QL are shown in Table 3 where it can be observed that limits were lower when the method was carried out in SMUF than in milk. Minimum values of DL and QL of 3.20 and 10.67 mU/ml were found when the determinations were performed in skim milk, which were similar to that obtained in whole milk, whereas for SMUF, DL and QL resulted 2.29 and 7.64 mU/ml.

Table 3. Detection and quantification limits calculated throughout Long and Winefordner criterion (1983) for the evaluated method to determine protease activity in whole (WM), skim milk (SM) or simulated milk ultrafiltrate (SMUF).

Sample	Slope ^a	Standard error ^b	DL ^c (mU/ml)	QL ^d (mU/ml)
WM	0.008	0.009	3.26	10.89
SM	0.015	0.015	3.20	10.67
SMUF	0.014	0.011	2.29	7.64

^aSlope of the calibration line

^bStandard error of the intercept point of the calibration line

^cDetection Limit

^dQuantification limit

Precision

Table 4 shows that relative standard deviations (RSD) of less than 8% were obtained in all systems and that all RSD were satisfactory according to the Horwitz criterion (Horwitz, 1982) (Table 4).

Table 4 Precision of the assayed method for the determination of protease activity in whole (WM), skim milk (SM) and simulated milk ultrafiltrate (SMUF) and acceptable values of Relative Standard Deviation (RSD) through HORWITZ criterion

Sample	Activity \pm DS ^a (mU/ml)	RSD(%)	RSD _{Horwitz}
WM	50.34 \pm 0.57	1.14	9.9
SM	47.78 \pm 3.82	7.99	8.9
SMUF	50.76 \pm 2.48	4.89	9.6

^aMean activity \pm standard deviation in mU/ml

^bAcceptable RSD value through HORWITZ criterium

Accuracy

The homogeneity of variances of the recovery was verified through a Cochran test (Table 5). The Student test showed that the recovery of the proteolytic activity did not depend on the enzyme concentration (Table 5). Therefore, the final recovery was the average of the results obtained in both levels of addition for each product (Table 5). Moreover, all the products led to a recovery similar to theoretical 100% (Table 5).

Table 5 Recovery of the evaluated method to determine protease activity in whole (WM), skim milk (SM) and simulated milk ultrafiltrate (SMUF)

Sample	Recovery (%)		Cochran test ^c	Student test-L ^d	Mean recovery	Student test-100 ^e
	Level I ^a	Level II ^b				
WM	103 \pm 4	105 \pm 2	0.79	1.82	104 \pm 3	4.05
SM	103 \pm 10	95 \pm 8	0.76	1.48	99 \pm 9	0.21
SMUF	100 \pm 1	102 \pm 1	0.70	1.44	101 \pm 3	1.25

^aAddition level I: 10 mU/ml

^bAddition level II: 50 mU/ml

^cCochran test, $C_{tab(2,5,0.01)} = 0.877$

^dTest to determine the difference among the recoveries obtained in levels I and II, $t_{tab} = 6.869$

^eTest to determine the differences among the mean recovery and the theoretical 100%, $t_{tab} = 4.437$

DISCUSSION

The evaluated method when performed in SMUF or milk with different fat content was significantly linear in the range of 0 to 50 mU/ml. The correlation coefficients of the calibration lines were determined to compare the goodness of the linearity. No differences

were observed on the r-values obtained when carrying out the method in the different milk systems ($P < 0.05$).

The sensitivity was studied throughout the parameters DL and QL and the least values were, respectively, 2.29 and 7.64 mU/ml. After a comparison of the results of sensitivity it was observed that the DL and QL obtained did not depend significantly on the kind of media. In terms of precision, the method fulfilled the Horwitz criterion in all the cases. So, it may be considered precise for being used in samples with different protein or fat content. The accuracy was studied through the recovery of two levels of addition. Results did not depend on the protease content of the samples, thus the recovery could be taken as the average of the recovery obtained in both different levels and in all the cases recovery was similar to the theoretical 100%.

This method is useful for determining the proteolytic activity in different media and its goodness does not depend on the fat or protein content of the sample, since the results obtained on the evaluated parameters were similar in SMUF (a fat and protein free solution), skim (fat free) and whole milk. Milk components do not interfere in the reliability of the results. So, the method is good enough to determine the proteolytic activity in all these different products.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the *Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (CICYT)* for supporting the work included in Project ALI97 0774, to the *Ministerio de Educación, Cultura y Deportes* for supporting the Ph. D. grant of Silvia Bendicho and to Granja Castelló S.A. (Mollerussa, Lleida, Spain) for supplying the milk.

REFERENCES

- Charney, J., & Tomarelli, R.M. 1947. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, 171, 501-505.
- Christen, G.L., & Marshall, R.T. 1984. Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *Journal of Dairy Science*, 67, 1680-1687.
- Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, 45, 172-207.
- Fields, R. 1972. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods in Enzymology*, 25, 464-468.
- Fox, P.F. 1981. Proteinases in dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35, 233-253.
- Gebre-Egziabher, A., Humbert, E.S., & Blankenagel, G. 1980. Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. *Journal of Food Protection*, 43(9), 709-712.
- Horwitz, W. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 54, 67-76.
- Hull, M.E. 1947. Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *Journal of Dairy Science*, 30, 881-884.
- Jeness, R., & Koops, J. 1962. Preparation of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 16(3), 153-164.

- Juffs, H.S. 1973. Proteolysis detection in milk. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. *Journal of Dairy Research*, 40, 371-381.
- Kohlmann, K.L., Nielsen, S.S., Steenson, L.R., & Ladisch, M.R. 1991. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 74, 3275-3283.
- Law, B. A., Andrews, A.T., & Sharpe, M.E. 1977. Gelation of UHT sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *Journal of Dairy Research*, 44, 145-178.
- Law, B.A. 1979. Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research*, 46, 573-588.
- Long, G.L., & Winefordner, J.D. 1983. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55, 712-724.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 163, 265-275.
- Moore, S., & Stein, W.H. 1954. A modified ninhydrin reagen for the photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 211, 907-913.
- Poffé, R., & Mertens, W. 1988. Heat stable proteases of psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 437-442.
- Rollema, H.S., Mckellar, R.C., Sørhaugh, T., Suhren, G., Zadow, J.G., Law, B.A., Poll, J.K., Stepaniak, L., & Vagias, G. 1989. Comparison of different methods for the detection of bacterial proteolysis enzymes in milk. *Milchwissenschaft*, 44, 491-496.
- Steel, R. G. D., & J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. McGraw Hill Book Co, New York, NY.
- Veisseyre, R. 1988. Lactología técnica. Ed. Acribia, Zaragoza.

Capítulo 3

Effects of High Intensity Pulsed Electric Field and Thermal Treatments on a Lipase from *Pseudomonas fluorescens*

S. Bendicho, C. Estela, J. Giner,
G. V. Barbosa-Cánovas and O. Martín

Journal of Dairy Science (2002) 85, 19-27.

ABSTRACT

Milk and dairy products may contain microorganisms capable of secreting lipases that cause sensory defects and technological problems in the dairy industry. In this study, the effects of thermal and high intensity pulsed electric field (HIPEF) treatments on an extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens*, suspended in a simulated skim milk ultrafiltrate (SMUF) have been evaluated. Heat treatments applied were up to 30 min from 50 to 90°C. HIPEF treatments were carried out using pilot plant facilities in a batch or continuous flow mode where treatment chambers consisted of parallel and coaxial configuration, respectively. Samples were subjected to up to 80 pulses at electric field intensities ranging from 16.4 to 37.3 kV/cm. This resulted in a lipase that was quite resistant to heat and also to HIPEF. High (75°C-15 s) and low pasteurization treatments (63°C-30 min) led to inactivations of 5 and 20%, respectively. Using the batch mode HIPEF equipment, a 62.1% maximum activity depletion was achieved after 80 pulses at 27.4 kV/cm. However, when HIPEF treatments were applied in the continuous flow mode, an inactivation rate of just 13% was achieved, after applying 80 pulses at 37.3 kV/cm and 3.5 Hz. The results of both heat and HIPEF treatments on enzyme inactivation were adjusted with good agreement to a first order kinetic model ($R^2 > 62.3\%$).

Key words: high intensity pulsed electric fields, lipase, enzymes, milk

INTRODUCTION

The widespread practice of storing raw milk at refrigeration temperatures prior to processing prevents spoilage by lactic acid-producing mesophilic bacteria (Fairbairn and Law, 1986). However, this practice has resulted in the selective growth of psychrotrophic microorganisms (Thomas, 1974; Cousins et al., 1977; Law, 1979).

The psychrotrophs found in refrigerated bulk milk are mainly Gram-negative bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* and *Enterobacter* (Thomas and Druce 1963, 1969; Lück, 1972; Murray and Stewart, 1978). Pseudomonads, especially strains of *Pseudomonas fluorescens* are the most commonly encountered psychrotrophs in dairy products (Muir et al., 1979; Richard, 1981; Cousin, 1982; Deeth and Fitz-Gerald, 1983). This species secretes a lipase whose presence in milk causes a highly unpleasant rancid flavor mainly due to the liberation of butyric acid after the hydrolysis of triglycerides (Andersson et al., 1981).

Milk preservation is currently accomplished by heating the milk, but most enzymes secreted by psychrotrophic microorganisms are resistant to thermal treatments (Lawrence, 1967; Cogan, 1977). The storage stability of UHT-sterilized milk becomes dependent on the content of heat resistant quality-degrading microbial enzymes in the raw milk (Andersson et al., 1981). Kishonti (1975) observed that several extracellular lipases from psychrotrophic bacteria in milk were able to maintain at least 75% of its initial activity following pasteurization treatment (63°C-30 min). Thus, rancid flavor may also appear in milk products that have been subjected to sterilization or pasteurization treatments (Andersson et al., 1981).

Because of the resistance of microbial lipases to heat treatment, nonthermal processes like high intensity pulsed electric fields (HIPEF) could be tried to inactivate them. HIPEF treatment involves applying very short electric pulses (μs) at high electric field intensities. Temperature is kept moderate during the process, in order to destroy the microorganisms, thus maintaining the food's fresh-like qualities and causing little depletion in the hydro or liposoluble vitamin content (Calderón-Miranda et al., 1999; Bendicho et al., 1999).

The HIPEF process destroys microorganisms in both milk and simulated milk ultrafiltrate (SMUF) (Zhang et al., 1994; Pothakamury et al., 1995a and 1995b; Dunn and Pearlman 1987; Martin et al., 1997; Michalac et al. 1999). But there are few studies about HIPEF's effect on milk enzymes. With the electrohydraulic treatment, Gilliland and Speck (1967) achieved significant inactivation of a protease from *Bacillus subtilis* in a buffer solution. The inactivation mechanism proposed for that enzyme was an oxidative reaction of key components by electric fields as a function of treatment time. Vega-Mercado et al. (1995a) achieved the inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens* in milk until up to 60% using HIPEF. Vega-Mercado et al., (1995b) and Castro et al. (1994) reported reductions higher than 90% for plasmin and alkaline fosfatase after a HIPEF treatment of milk. However, Grahl and Märkl (1996) only observed a slight depletion of alkaline fosfatase in milk, similar to that obtained by Ho et al. (1997) in a buffer solution. This latter author also studied the behavior of other milk enzymes when subjected to HIPEF in buffer solutions and obtained variable results. For lipase and peroxidase, up to 85% and 30% inactivation was achieved, respectively (Ho et al., 1997). Grahl and Märkl (1996) obtained similar results with lipase and peroxidase in milk. Other enzymes such as lysozyme and pepsine showed an increase in activity, the former a rise of activity in certain ranges of voltage, whereas the latter reached up to double its initial activity (Ho et al., 1997).

The purpose of this work was to study the effect of batch and continuous HIPEF treatments on the destruction of a thermoresistant lipase from *Pseudomonas fluorescens* in SMUF and also to compare the effect of HIPEF to heat treatments.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

This study was conducted with simulated milk ultrafiltrate (SMUF) (Table 1), a salt solution with composition encountered in milk ultrafiltrates. It was proposed by Jeness and Koops (1962) and widely used in nonthermal processing research. The conductivity of SMUF was adjusted to 5.20 mS/cm, in order to be electrically similar to milk.

Lipase from *Pseudomonas fluorescens* [9001-62-1], in powder form (42 U/mg), was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). The enzyme activity was expressed in mU/ml after verifying the existence of a linear correlation between enzyme activity in mU/ml (from commercial information) and enzyme concentration in mg/ml using the analytical method (Bendicho et al., 2001) described in the section “enzyme determination”.

Before running the treatments, the enzyme lipase was added to SMUF to a concentration level of 300 mU/ml.

Table 1. Composition of simulated skim milk ultrafiltrate (SMUF)[†] (Jeness and Koops, 1962).

Lactose	50.00
Potassium phosphate	1.58
Tri-potassium citrate	0.98
Potassium sulphate	0.18
Tri-sodium citrate	1.79
Calcium chloride dehydrate	1.30
Magnesium citrate	0.38
Potassium carbonate	0.3
Potassium chloride	1.00

[†]The values are expressed in g/l.

Thermal treatments

Several heat treatments including high (75°C-15 sec) and low (63°C-30 min) pasteurization were applied to SMUF for use as reference values (Table 2). Samples were placed in 5-ml test tubes and heated at preselected temperatures 50, 55, 63, 75 and 90°C in a thermostatic bath (Clifton ND-4, Nickel Electron LTD, Weston-Super-Mare, England). Temperature was measured with a temperature probe (H9043, Hanna instruments,

Guipúzcoa, Spain) immersed in the solution. Aliquots of the sample were removed at specified intervals (Table 2) and cooled with ice until activity determination.

Table 2. Experimental conditions for heat treatment

Temperature (°C)	Time (min)
90	0.25, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30
75	0.25, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30
63	5, 10, 15, 20, 30
55	5, 10, 15, 20, 30
50	5, 10, 15, 20, 30

Pulsed electric field treatments

HIPEF treatments were carried out at two different pilot plant facilities, a batch (University of Lleida) and a continuous one (Washington State University), both manufactured by Physics International (San Leandro, CA). In both cases, the delivered pulses had an exponential decaying waveform.

The batch mode equipment had a generator with a capacitance of 0.1 μF . The treatment chamber was a parallel plate with a 1.5 cm electrode gap and a volume of 12.4 ml (Figure 1). The peak electric field intensities reached in the chamber were 16.4, 18.5, 22.7 and 27.4 kV/cm. The number of pulses applied was 10, 20, 40, 60, and 80. The temperature of the sample was measured before and immediately after the treatments with a temperature probe (H9043, Hanna instruments, Guipúzcoa, Spain). The temperature, initially at 18-20°C, never exceeded 34°C.

The continuous HIPEF system had a 0.5 μF capacitor and a coaxial treatment chamber containing two stainless steel electrodes with a gap of 0.67 cm and a volume of 30.56 cm^3 (Figure 2). In this case, the electric field intensities applied were 26.1, 30.5 and 37.3 kV/cm.

Frequencies from 2 to 3.5 Hz were tested up to 80 pulses. An attempt was tried at higher field strengths and frequencies, but at those conditions, dielectric breakdown occurred which caused an undesirable arcing phenomenon. The flow rate of SMUF was 500 ml/min, controlled by a variable speed pump (Masterflex 7654-00, Cole Palmer Instruments Co., Chicago, IL). A cooling coil immersed in iced water was used to cool the SMUF at the entrance and exit of the treatment chamber. The temperature of the entrance and exit was recorded with a digital thermometer (John Fluke Mfg. Co., Everett, WA). The inlet temperatures were between 3 and 6°C and the maximum outlet temperature was 35°C.

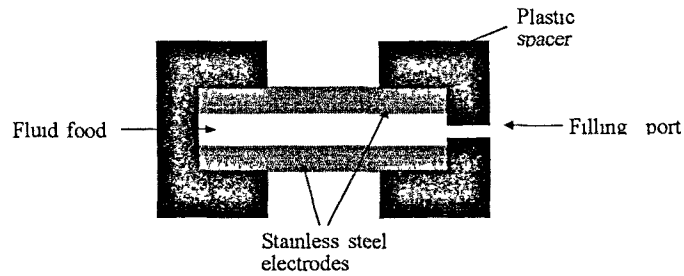


Figure 1 Scheme of the static chamber designed at the University of Lleida

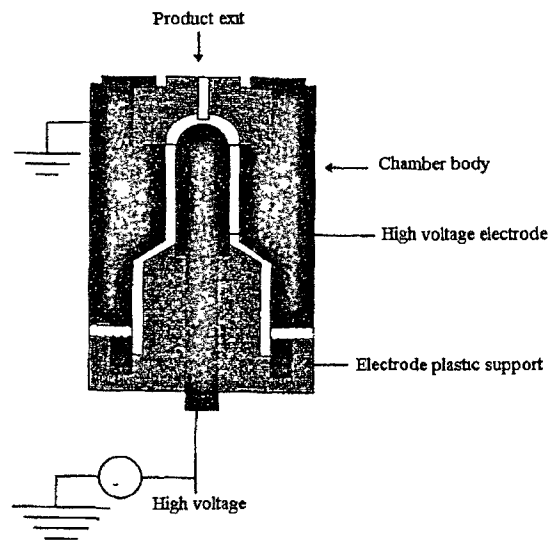


Figure 2 A cross-sectional view of the modified coaxial treatment chamber designed, constructed, and tested for microbial inactivation at WSU (Martín-Belloso et al , 1997)

In both cases the input energy supplied per volume unit in each pulse (Q , J/l) can be computed by Equation 1

$$Q = \frac{V_0^2 \cdot C}{2 \cdot v} \quad \text{Equation 1}$$

where V_0 is the peak voltage (V), C the capacitance of the capacitor (F), and v the volume of the treatment chamber (l)

Enzyme determination

Solutions

Prior to running the analysis to determine lipase activity, a p-NPC solution (0.005 M) was prepared adding 1326.50 mg of p-NPC (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) to 1000 ml of DMSO (Riedel de Haën, Seelze, Germany). A pH 8.5 buffer was prepared mixing 250 ml of THMA 0.2 M (Prolabo, Fontenay S/Bois, France) with 173 ml of HCl 0.1 M (Prolabo, Fontenay S/Bois, France) and diluting it with distilled water to 1000 ml.

Lipase activity determination

Lipase activity was quantified using a spectrophotometric method described and validated by Bendicho et al. (2001). To run the analysis in SMUF, 50 µl of p-NPC solution, 3 ml of pH 8.5 buffer and 400 µl of the SMUF sample containing the enzyme, were placed in a test tube. This mixture was incubated at 37°C for 30 min in a thermostatic bath (Clifton ND-4, Nickel Electron LTD, Weston-Super-Mare, England). Finally, the mixture was transferred into cuvettes to read the absorbance at 412 nm in a spectrophotometer UV/Visible (CE 1021, CECIL, Cambridge, England).

In both HIPEF and thermal treatments, lipase activity of control and processed samples was measured at the same time and immediately after processing to avoid the effects of time in storage.

Statistics

Each processing condition was assayed in duplicate and enzyme determination was also performed in duplicate. Therefore, the results were averages of four measurements. Enzyme activity was expressed as relative activity [RA(%)] and computed using the following expression:

$$RA = 100 \cdot \frac{A_t}{A_0}$$

where A_t is the enzyme activity in the sample following treatment and A_0 the enzyme activity of the untreated sample.

Analysis of variance was used to determine significant differences among treatments ($p=0.05$) and was performed by "Statgraphics plus" version 2.1 for Windows package (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA, 1996).

The reduction of enzyme activity as a function of treatment time for each thermal treatment may be adjusted to a first-order kinetic model (Equation 2). The Arrhenius model was used to adjust the k_T -values to the treatment temperature (Equation 3).

$$RA = RA_0 \cdot e^{-k_T \cdot t} \quad \text{Equation 2}$$

$$k_T = k_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Equation 3}$$

where RA_0 is the intercept of the curve, k_T the first order constant for each evaluated temperature (min^{-1}), t the treatment time (min), E_a the energy of activation (J/mol), R the constant of the ideal gases ($8.31 \text{ J}^\circ\text{K}\cdot\text{mol}$) and T the treatment temperature ($^\circ\text{K}$).

Also, an exponential decay model, was used to describe the inhibition of enzyme by HIPEF. Thus, lipase activity depletion might be expressed mathematically by Equation 4.

$$RA = RA_0 \cdot e^{-k_E \cdot N} \quad \text{Equation 4}$$

where RA_0 is the intercept of the curve, N the number of pulses, and k_E the first order kinetic constant for each electric field intensity evaluated (pulses^{-1}).

RESULTS

Thermal treatments

Lipase from *Pseudomonas fluorescens* showed a high resistance to heat. Results indicated that after any thermal treatment there was a significant reduction ($P < 0.05$) in lipase activity with increasing temperature or treatment time (Figure 3). However, neither a low temperature pasteurization treatment (63°C -30 min) nor a high one (75°C -15 s.) could totally inactivate the enzyme. Only 20% and 5% depletions were reached, respectively. To achieve a near complete depletion, 30 min were required at 75°C or 5 min at 90°C .

The values of $RA(\%)$ as a function of heat treatment time were adjusted to a first-order kinetic model (Equation 2). The model displayed a high determination coefficient (R^2), which varied from 0.623 to 0.978 (table 3). The first order kinetic constant values (k_T) ranged from 0.0024 to 0.0931 min^{-1} and the increase in treatment temperature involved an exponential raise in the first-order k_T values. Under the evaluated conditions, the influence of temperature (T) on k_T could be described by the Arrhenius equation (Equation 5) ($R^2=0.978$) (Figure 4). The activation energy (E_a) obtained in this range (50 - 90°C) was 134.48 kJ/mol .

$$k_T = 1.33 \cdot 10^{19} \cdot e^{\left[\frac{-134.48}{(8.31 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right]} \quad \text{Equation 5}$$

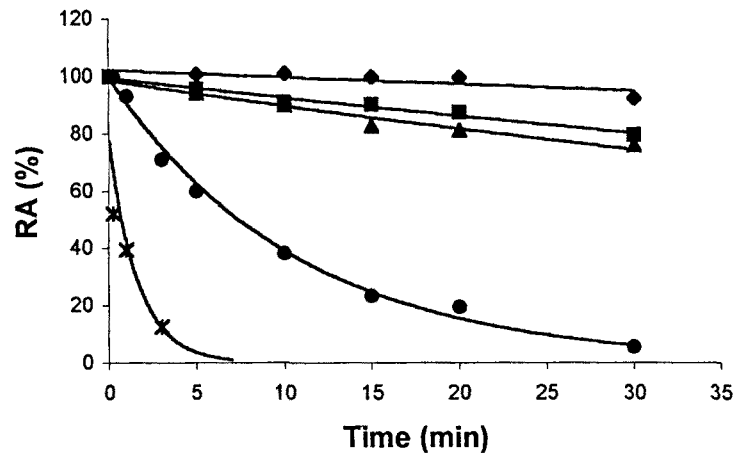


Figure 3. Inhibition of relative lipase activity (RA) exposed to different thermal treatments. Treatments were performed at 50 (◆), 55 (■), 63 (▲), 75 (●) and 90°C (*). The plotted line correspond to the fit of experimental data to a first-order kinetic model.

Table 3. Exponential decay model rate constants (k_T) for inhibition of lipase activity in simulated milk ultrafiltrate by heat at different temperatures.

Temperature (°C)	k_T (min ⁻¹)	R ²
50	0,0024	0.623
55	0,0071	0.958
63	0,0093	0.960
75	0,0931	0.978

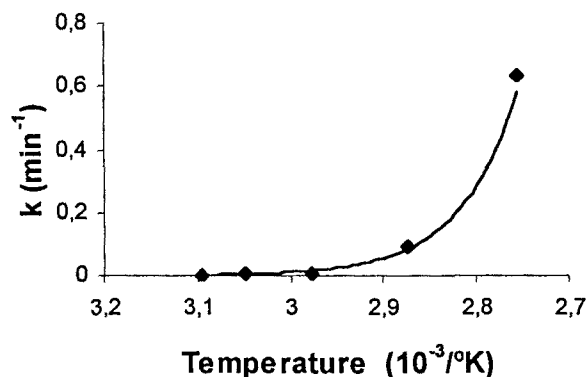


Figure 4. Effect of the temperature on the rate constant (k_T) in first order kinetic model used to describe the inhibition of lipase activity by heat treatments. Plotted line is an exponential decay fit.

Pulsed electric field treatments

Batch mode HIPEF

When the SMUF samples containing lipase were treated with batch mode HIPEF, it was observed that the enzyme activity lowered as the electric field intensity and number of pulses increased (Figure 5). The inactivation obtained at 16.4 and 18.5 kV/cm showed analogous behavior patterns ($P < 0.05$), reaching up to a 33.5% depletion after an 80-pulse treatment. However, maximum lipase inhibition was achieved when samples were subjected to 80 pulses at 27.4 kV/cm. Under these conditions reductions up to 62.1% were achieved.

The experimental values of RA as a function of number of pulses were adjusted to an exponential decay equation to model the inactivation kinetics of lipase by HIPEF (Figure 5). The calculated rate constants (k_E) and regression parameters of the fitted model ($P = 0.05$) at the assayed electric field intensities are reported in Table 4. The adjusted R-squared statistic values, which varied from 0.702 to 0.958, indicated that the assayed model explains well the relationship between RA and HIPEF treatment. The values of the resulting rate constants (k_E) ranged from 0.0062 to 0.0128 pulse $^{-1}$. Rate constants increased significantly when electric field intensity was boosted. Results from this fitting showed a positive and strong exponential dependence ($R^2 = 0.964$) between k_E and E (Figure 6). Thus, under these conditions, the influence of E on k_E can be described by Equation 6:

$$k_E = 0.0012 \cdot e^{0.0842E}$$

Equation 6

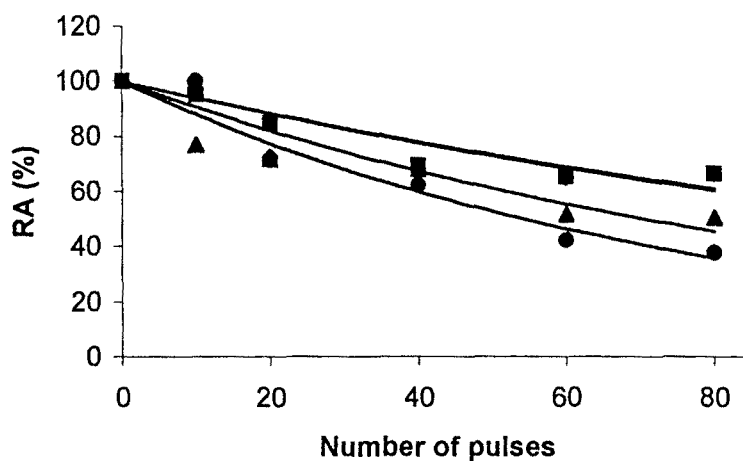


Figure 5. Inhibition of lipase activity after several batch mode high intensity pulsed electric field (HIPEF) treatments. Treatments were performed at 16.4 (◆), 18.5 (■), 22.7 (▲) and 27.4 kV/cm (●). The plotted line correspond to the fit of experimental data to a first-order kinetic model.

Table 4. Exponential decay model rate constants (k_E) for inhibition of lipase activity in simulated milk ultrafiltrate by pulsed electric fields in batch mode at different electric field intensities.

Electric field intensity (kV/cm)	k_E (pulse ⁻¹)	R^2
16.4	6.2×10^{-3}	0.702
18.5	6.3×10^{-3}	0.855
22.7	9.8×10^{-3}	0.820
27.4	1.28×10^{-2}	0.958

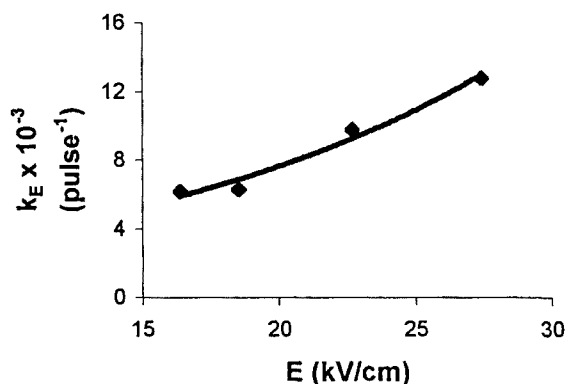


Figure 6. Effect of the electric field intensity (E) on the rate constant (k_E) in first order kinetic model used to describe the inhibition of lipase activity by batch mode pulsed electric field treatments. Plotted line is an exponential decay fit.

Continuous mode HIPEF

Lipase activity varied with any increase in number of pulses applied and electric field intensity ($P < 0.005$) when SMUF samples were exposed to continuous mode HIPEF treatments. By holding the rest of the variables constant, the application of pulses at 2 or 3.5 Hz showed a different extent of inhibition.

At 2 Hz, it was observed that 26.1 kV/cm led to different results of enzyme inactivation than that obtained with 30.5 and 37.3 kV/cm. The latter showed a similar behavior pattern of inhibition ($P < 0.05$). The lower electric field intensity (26.1 kV/cm) led to a slight inactivation (3.2%), even after an 80-pulse treatment, whereas the activity decrease reached 6.9% when samples were subjected to 30.5 or 37.3 kV/cm (Figure 7). In these three cases, inactivation increased exponentially (R^2 : 0.88-0.97) with the number of pulses. The first-order k_E -values obtained from each field strength adjustment ranged from 4×10^{-4} to 9×10^{-4} pulses $^{-1}$.

Different results were obtained when applying similar conditions at 3.5 Hz. In this case, the maximum extent of inhibition (13%) was achieved when the samples were subjected to 80 pulses at 37.3 kV/cm (Figure 7). The electric field intensity that held the lowest inactivation level was the intermediate one (30.5 kV/cm) which achieved only a 2.3% decrease after an 80-pulse treatment. As for the 2-Hz results, the enzyme inactivation for each evaluated electric field intensity could be adjusted with good agreement to exponential models that held k_E -values from 3×10^{-4} to 1.6×10^{-3} pulses $^{-1}$ (R^2 : 0.782- 0.952) (Table 5).

It can be observed that the 3.5-Hz treatments led to higher levels of enzyme inactivation than did the 2-Hz treatments, which could be advantageous since the higher the process frequency the faster the achievement of equivalent treatments. Thus, the 3.5-Hz process besides being faster is more effective than the 2-Hz one.

The kinetic constants obtained could not be adjusted to any kinetic model because the resulting linear k_E -values not always increased proportionally to the field strength applied.

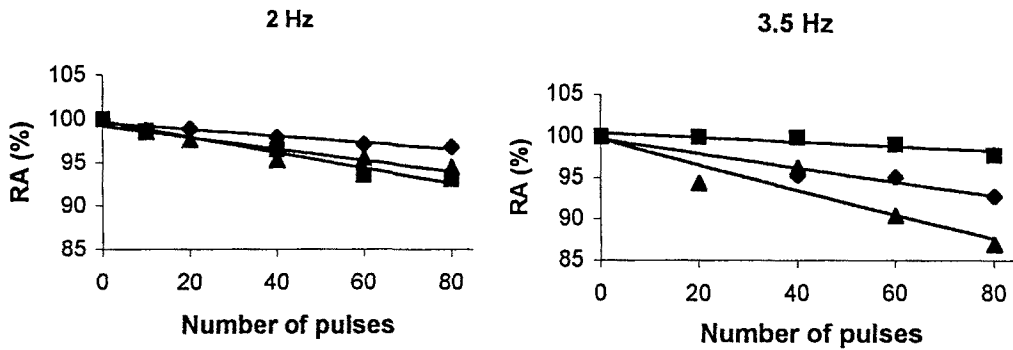


Figure 7. Inhibition of relative lipase activity (RA) exposed to 2 and 3.5- Hz high intensity pulsed electric field treatments. Treatments were performed at 26.1 (◆), 30.5 (■) and 37.3 kV/cm (▲). Plotted lines are exponential decay fits.

Table 5. . Exponential decay model rate constants (k_E) for inhibition of lipase activity in simulated milk ultrafiltrate by pulsed electric fields in continuous mode at different electric field intensities.

Frequency (Hz)	Electric field intensity (kV/cm)	k_E (pulse ⁻¹)	R^2
2	26.1	4×10^{-4}	0.929
	30.5	9×10^{-4}	0.967
	37.3	7×10^{-4}	0.882
3.5	26.1	9×10^{-4}	0.952
	30.5	3×10^{-4}	0.782
	37.3	1.6×10^{-3}	0.879

Lipase inactivation as a function of supplied energy per unit volume

Energy densities supplied to the samples in all the different HIPEF experimental conditions were calculated from Equation 1 and multiplied by the applied number of pulses. As observed in Figure 8, the RA of lipase as related to the supplied energy densities (Q) could be successfully described by a first-order kinetic model for both batch ($R^2=0.897$) and continuous ($R^2=0.644$) treatments (Equations 7 and 8). The k -values obtained were 1.9×10^{-3} l/kJ in the batch mode treatment and 2×10^{-4} l/kJ in the continuous one.

$$RA = 94.24 \cdot e^{-1.9 \cdot 10^{-3} \cdot Q} \quad \text{Equation 7}$$

$$RA = 99.40 \cdot e^{-0.2 \cdot 10^{-3} \cdot Q} \quad \text{Equation 8}$$

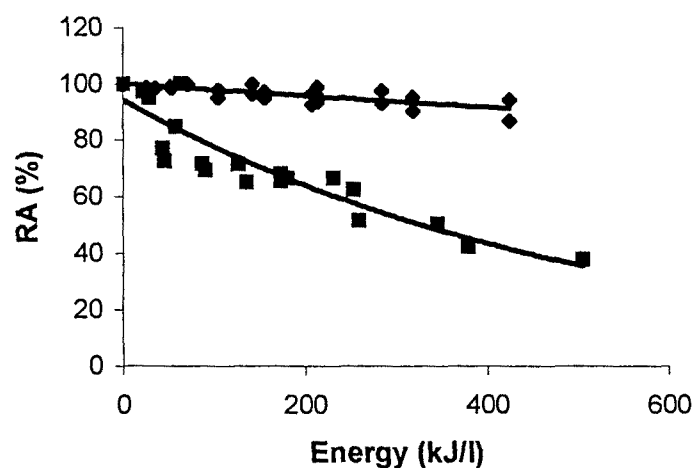


Figure 8. Relative lipase activity (RA) in simulated milk ultrafiltrate exposed to different inputs of electric energy densities (Q) supplied by high intensity pulsed electric fields (HIPEF) treatments in batch (■) or continuous mode (◆). Plotted lines are exponential decay fits.

DISCUSSION

The evaluated lipase from *P. fluorescens* was quite resistant to currently used thermal treatments (75°C-15 s. and 63°C-30 min). High and low pasteurization treatments led to inactivations of 5 and 20%, respectively. Griffiths et al. (1981), in studying the behavior of a lipase from another strain of *P. fluorescens*, also noticed that the enzyme showed resistance to heat; after a thermal treatment of 77°C-17 s., they observed a 35% decrease in activity. Other authors also have highlighted the thermoresistance of extracellular enzymes from milk psychrotrophic bacteria. Kishonti (1975) found that, in general, several lipases were able to maintain at least 75% of its initial activity after a treatment of 63°C-30 min. Driessen (1983) and Andersson et al (1981) found lipase activity in pasteurized and UHT treated milk that resulted in an off flavor due to milk fat hydrolysis.

The depletion of enzyme activity related to treatment time for each studied temperature followed a first order kinetics. The results were consistent with those reported by Driessen (1983) for several thermoresistant extracellular lipases from Gram-negative bacteria when processed at different temperatures (85°C to 110°C). Moreover, the k_T obtained in the range

of temperatures studied (50-90°C) could be adjusted to the Arrhenius model. The E_a for lipase was 134.48 kJ/mol, similar to the value reported by Driessen (1983) in the range of 50 to 60°C for a lipase from *Pseudomonas fluorescens* 22F (185.362 kJ/mol).

As regards the HIPEF process, it affected the activity of this thermoresistant lipase, although the level of inactivation depended on the treatment applied. When using a batch mode HIPEF process, up to a 62.1% lipase inhibition was attained after an 80-pulse treatment at 27.4 kV/cm. To reach similar results applying heat, 10 min at 75°C or 1 min at 90°C was needed, whereas heat treatments of 10-15 min at 63°C or 1-3 min at 75°C would achieve the maximum reduction reported for the continuous treatment mode.

Ho et al. (1997) also studied the effect of HIPEF on a lipase, but in a buffer solution. Its activity was reduced up to 85% after applying 30 pulses at 90 kV/cm with the continuous HIPEF equipment. No more references have been found regarding the inhibition of any lipase by HIPEF. However, several studies exist as to the effect of HIPEF on other milk enzymes. Using a batch mode HIPEF system, Castro et al. (1994) achieved nearly the same extent of inactivation for alkaline phosphatase than that obtained in the present study for lipase under similar electrical conditions.

The level of lipase inactivation reached when processing the samples in continuous mode (13%) was widely overtaken when plasmin added to SMUF or a protease from *Pseudomonas fluorescens* added to skim milk, were treated using the continuous mode HIPEF equipment (Vega-Mercado et al., 1995a). Plasmin was reduced in a 90% after 50 pulses at both 30 and 45 kV/cm, and a 60% reduction was attained for protease when 14 or 15 kV/cm and 98 pulses were applied at pulsing rates of 1 and 2 Hz.

The depletion of lipase could be adjusted to the applied number of pulses for all electric field intensities studied, in both batch and continuous treatments. The higher the number of pulses the higher the inactivation level achieved. The results could be adjusted to a first order kinetic model. Moreover, the batch mode treatment k_E -values increased exponentially with the processing field strength. No references have been found concerning the inhibition kinetic constants of any lipase treated with HIPEF in milk or similar medium. But the kinetic behaviour of the considered lipase when submitted to batch mode HIPEF treatments agrees with that reported by Giner et al. (2000 and 2001) for vegetable or fruit enzymes. The activity of tomato pectin methylesterase and apple and pear polyphenoloxidase, processed with batch mode HIPEF equipment, also decreased exponentially with the number of pulses (Giner et al., 2000). Giner et al. (2000 and 2001) also adjust the k_E to the electric field intensity in a first order kinetic model.

The effectiveness of both HIPEF treatments can be compared by means of the energy required for each HIPEF treatment. Using the HIPEF batch mode system, the maximum energy applied was 504.97 kJ/l which led to a maximum lipase inhibition of up to 62.1%. However, with a similar value of energy (424.36 kJ/l) in the continuous mode equipment, released when an 80-pulse at 37.3 kV/cm process was applied, only a 13% decrease in activity was observed. In both cases, enzyme depletion increased exponentially with the supplied energy. Giner et al. (2000) also proposed exponential adjustments to model enzyme inhibition by the energy applied, but reported that much higher values of energy (about 35000 kJ/l) were needed to achieve near complete inactivation of tomato pectin methylesterase or apple and pear polyphenoloxidases.

The batch mode treatment was much more effective than the continuous one. This was unexpected because with the batch HIPEF system the field strengths applied were lower and the pulse width shorter. So, at the evaluated conditions, it was observed that the response of enzymes to HIPEF did not depend as much on the strength of treatment, which is opposite of that reported for microorganisms. Martín et al. (1997) found that continuous mode treatment was more effective in the inactivation of *E. coli* than the batch mode. These results are consistent with those reported by other authors who also found that enzymes presented different behavior patterns than microorganisms. Depending on the enzyme itself and on the treatment conditions, the effect of HIPEF can be very different. Ho et al. (1997) observed that depending on the kind of enzyme, results could vary from high depletion to an increase in initial activity. They obtained up to an 85% decrease in peroxidase, whereas pepsine activity showed a raise of up to 250%. Concerning the treatment conditions, Vega-Mercado et al. (1995a) obtained very different results as to the effect of HIPEF on a protease from *P. fluorescens* in milk. The effects of HIPEF on proteolytic activity varied from a 60% inactivation when processing the samples at low intensity electric fields (14 and 15 kV/cm) and high pulse rates (1 and 2 Hz) to an increase in initial proteolytic activity when exposure to HIPEF was performed at low pulse rates (0.6 Hz) and 25 kV/cm. As for lipase, the inactivation patterns depended on the electrical conditions applied.

Application of HIPEF might have affected the forces involved in maintaining the three-dimensional structure, because denaturation of the enzyme was observed. However, the conformational changes in the molecule that take to an inhibition of the activity better occurred with the batch HIPEF system, possibly due to the superiority of the voltage applied, the slowness of the treatment, or the length of the pulse delay.

CONCLUSIONS

It has been proved that this lipase from *P. fluorescens* is quite resistant to temperature and also to HIPEF. The effectiveness of HIPEF treatments depends on the electrical conditions and on the treatment mode. The batch mode HIPEF process inhibits the lipase activity more significantly than the continuous mode. A first-order kinetics properly matches lipase depletion with the number of pulses applied. Moreover, the batch-mode rate constants increase exponentially when the applied electric field intensity goes up.

Decrease of lipase activity with input electric energy density can be adequately modeled by a first-order kinetic model in both treatment modes, although the k -value obtained was much higher for the batch mode process.

In this work, it has been proved that the activity of a bacterial thermoresistant enzyme can be reduced using HIPEF. However, further research is needed to establish treatments that are more effective, to find the inactivation mechanisms and to generalize the effect of HIPEF on native enzymes in milk.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of Spain for their support of the work included in Project ALI 97 0774, and also thank the Ministerio de Educación, Cultura y Deportes for supporting the research grant involved and the stay at Washington State University (Pullman, WA, USA) by Silvia Bendicho.

REFERENCES

- Andersson, R. E., Danielsson, G., Hedlund, C. B., and S.G. Svensson. 1981. Effect of heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. *J. Dairy Sci.* 64: 375-379.
- Bendicho, S., Espachs, A., Stevens, D., Arántegui, J., and O Martín. 1999. Effect of High Intensity Pulsed Electric Fields on Vitamins of Milk. European conference of emerging food science and technology, Tampere, Finland.
- Bendicho, S., Trigueros, M.C., Hernández, T., and O Martín. 2001. Validation and comparison of analytical methods based on the release of p-nitrophenol to determine lipase activity in milk. *J. Dairy Sci.* 84: 1590-1596.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 19-30.
- Castro, A.J. 1994. Pulsed electric field modification of activity and denaturation of alkaline phosphatase. Ph.D. thesis, Washington State University, Pullman, Washington.
- Cogan, T.M. 1977. A review of heat-resistant lipases and proteinases, and the quality of dairy products. *Irish J. Food Sci. Technol.* 1: 95-105.
- Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Food Prot.* 45: 172-207.
- Cousins, C.M., Sharpe, M.E., and B.A. Law. 1977. The bacteriological quality of milk for cheddar cheesemaking. *Dairy Ind. Int.* 42: 12-13, 15, 17.
- Deeth, H.C., and C.H. Fitz-Gerald. 1983. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In *Dairy Chemistry – 2: Lipids* ed. Fox, P. F. Pp. 195-239. Barking: Applied Science Publishers.
- Driessen F.M. 1983. Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for keeping quality of milk products. Ph. D. Thesis. Agricultural University of Wageningen, Netherlands.
- Dunn, J.E., and J.S. Pearlman. 1987. Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. US Patents n° 4 695 472.
- Fairbairn, D.J., and B.A. Law. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53: 139-177.
- Giner J., Gimeno, V., Espachs, A., Elez, P., Barbosa-Cánovas, G.V., and O. Martín. 2000. Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* 1: 57-67.
- Giner J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G.V., and O. Martín. 2001. Effects of Pulsed Electric Fields Processing on Apple and Pear Polyphenoloxidases. *Food Sci. and Technol. Int.* (in press).
- Gilliand, S.E., and M.L. Speck. 1967. Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. *Appl. Microbiol.* 15 (5): 1031-1037.
- Grahl, T., and H. Märkl. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 148-157.
- Ho, S.Y., Mittal, G.S., and J. D. Cross. 1997. Effects of high electric pulses on the activity of selected enzymes. *J. Food Eng.* 31: 69-84.
- Jeness, R., and J. Koops. 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* 16 (3): 153-164.
- Kishonti, E. 1975. Influence of heat resistant lipases and proteases in psychrotrophic bacteria on product quality. *Annu. Bull. Int. Dairy Fed.* 86: 122-124.

- Law, B A 1979 Reviews of the progress of Dairy Science Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products *J Dairy Res* 46 573-588
- Lawrence, R C 1967 Microbial lipases and related esterases Part II Estimation of lipase activity Characterization of lipases Recent work concerning their effect on dairy products *Dairy Sci Abstr* 29 59-70
- Luck, H 1972 Bacteriological quality tests for bulk-cooled milk *Dairy Sci Abstr* 34 101-122
- Martín, O , Qin, B L , Chang, F J , Barbosa-Cánovas, G V , and B G Swanson 1997 Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields *J Food Proc Eng* 20 317-336
- Michalac, S L , Álvarez, V B and Q H Zhang 1999 Microbial reduction in skim milk using PEAC technology IFT Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Chicago, Illinois, USA
- Muir, D D , Philips, J D , and D G Dalgleish 1979 The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk *J Soc Dairy Technol* 32 19-23
- Murray, J G , and Stewart, D B 1978 Advances in the microbiology of milk and dairy products *J Soc Dairy Technol* 31 28-35
- Pothakamury, U R , Monsalve-González, A , Barbosa-Cánovas, G V , and B G Swanson 1995a High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii* *Rev Esp Cienc Tecnol Aliment* 35 101-107
- Pothakamury, U R , Monsalve-González, A , Barbosa-Cánovas, G V , and B G Swanson 1995b Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology *Food Res Int* 28 167-171
- Richard, J 1981 Classification adansonienne et identification de *Pseudomonas* psychrotrophes isolés du lait cru conservé à basse température *Ann Microbiol (Institut Pasteur)* 132A 171-182
- Thomas, S B 1974 The microflora of bulk-collected milk – part 2 *Dairy Ind* 39 279-282
- Thomas, S B , and R G Druce 1963 Types of psychrophilic bacteria in milk *Dairy Eng* 80 378-381
- Thomas, S B , and R G Druce 1969 Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurized milk A review *Dairy Ind* 34 351-505
- Vega-Mercado, H , Powers, J , Barbosa-Cánovas, G V , Swanson, B G , and L- Luedeche 1995a Inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 using high voltage pulsed electric fields IFT Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Anaheim, California
- Vega-Mercado, H , Powers, J , Barbosa-Cánovas, G V , and B G Swanson 1995b Plasmin inactivation with pulsed electric fields *J Food Sci* 60 1143-1146
- Zhang, Q , Monsalve-González, A , Barbosa-Cánovas, G V , and B G Swanson 1994 Inactivation of *Escherichia coli* and *Sacharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions *Trans Am Soc Agric Eng* 37 581-587

Capítulo 4

Inactivation kinetics of a lipase from *Pseudomonas fluorescens* exposed to High Intensity Pulsed Electric Fields

S. Bendicho, J. R. Rosell, G. V. Barbosa-Cánovas, O. Martín

International Dairy Journal (submitted)

ABSTRACT

The inactivation kinetics of a lipase from *Pseudomonas fluorescens* through the application of high intensity pulsed electric fields (HIPEF) were studied in simulated milk ultrafiltrate (SMUF). Samples were subjected up to 314.5 μs at electric field intensities ranging from 16.4 to 27.4 kVcm^{-1} . Exponential models (related to treatment time and field strength) and the Equations of Hülshager and Fermi fitted well enough residual lipase activity (RA) with both treatment time and field strength ($P=0.05$).

Keywords: High intensity pulsed electric fields, lipase, inactivation kinetics, skim milk ultrafiltrate.

INTRODUCTION

Pseudomonads, especially strains of *Pseudomonas fluorescens*, are the most commonly encountered psychrotrophs in dairy products (Muir, Philips & Dalgleish, 1979; Richard, 1981; Cousin, 1982; Deeth & Fitz-Gerald, 1983). This species secretes a lipase whose presence in milk causes a highly unpleasant soapy flavor, mainly due to the liberation of butyric acid after the hydrolysis of triglycerides (Andersson, Danielsson, Hedlund & Svensson, 1981). Moreover, most lipases from psychrotrophic microorganisms can resist mild heat treatment such as pasteurisation, which implies a great inconvenience from a commercial viewpoint (Lawrence, 1967; Cogan, 1977).

Because of the resistance of this lipase to heat treatment, nonthermal processes such as high intensity pulsed electric fields (HIPEF) could be used to inactivate the enzyme. In the HIPEF process very short electric pulses (μs) at high electric field intensities are applied, while keeping the treatment temperature moderate ($<60^\circ\text{C}$) in order to destroy the microorganisms but to maintain the food's fresh-like quality without depletion of hydro- or liposoluble vitamin content (Calderón-Miranda, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1999; Bendicho, Espachs, Stevens, Arántegui & Martín, 1999).

Most of the published literature on HIPEF processing of milk or simulated milk ultrafiltrate (SMUF) is mainly focused on the inactivation of microorganisms, wherein it has been proved that this process leads to high levels of microbial inactivation (Martín, Qin, Chang, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1997; Pothakamury, Monsalve-González, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1995a & 1995b). However, different results on enzyme inactivation have been obtained depending on the treatment applied and the kind of enzyme. Using this treatment, Vega-Mercado, Powers, Barbosa-Cánovas, Swanson and Luedeche (1995) achieved up to a 60% inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens*. However, no variation in initial activity was observed in a protease from *Bacillus subtilis* after the HIPEF process (Bendicho, Martí, Fernández-Molina, Barbosa-Cánovas & Martín, 2001). Activity reductions higher than 90% were achieved for plasmin and alkaline fosfatase (Vega-Mercado, Powers, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1995; Castro, 1994). Moreover, it has been proven that HIPEF application could accomplish high levels of inactivation of a lipase from *Pseudomonas fluorescens*, although with using more intensive treatment than required for microorganisms (Bendicho, Estela, Fernández-Molina, Barbosa-Cánovas & Martín, 2001).

There is limited kinetic data pertaining to enzymatic activity after HIPEF treatment, and only our research team in different publications (Giner-Seguí, Rauret-Ariño, Barbosa-Cánovas & Martín-Belloso, 1997; Giner, Gimeno, Barbosa-Cánovas, & Martín, 2001a; Giner, Gimeno, Espachs, Elez, Barbosa-Cánovas, & Martín, 2001b) have used kinetic models for describing the inhibition of enzymes after such treatments. Giner, Gimeno, Espachs, Elez, Barbosa-Cánovas and Martín (2000) and Giner et al. (2001a and 2001b) found, respectively, that the inactivation of pectin methylesterase and polyphenoloxidase could be adjusted to empirical models used previously to describe microbial destruction (Hülshager, Potel & Niemann, 1983; Peleg, 1995; Arántegui, Marín, Rosell & Martín, 2000; Martín, Qin, Chang, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1997) and also described new equations to predict vegetable enzyme inactivation.

The purpose of this work was to characterize the inactivation of a thermoresistant lipase from *Pseudomonas fluorescens* in SMUF by HIPEF through different kinetic models.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

This study used a solution similar to skim milk ultrafiltrate (SMUF) (Table 1) that was proposed by Jenness and Koops (1962) and widely used in HIPEF studies.

Enzyme lipase (42 U mg^{-1}) from *Pseudomonas fluorescens* [9001-62-1] was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany) in powdered form. Enzyme activity was expressed in mU mL^{-1} after verifying the existence of a linear correlation between the enzyme activity in mU mL^{-1} (from commercial information) and enzyme concentration in mg mL^{-1} using the analytical method.

Prior to treatment, the enzyme lipase was added to the SMUF to a concentration level of 300 mU mL^{-1} .

Table 1. Composition of the simulated skim milk ultrafiltrate (SMUF)^a (Jeness & Koops, 1962).

Lactose	50.00
Potassium phosphate	1.58
Tri-potassium citrate	0.98
Potassium sulphate	0.18
Tri-sodium citrate	1.79
Calcium chloride dehydrate	1.30
Magnesium citrate	0.38
Potassium carbonate	0.3
Potassium chloride	1.00

^a Values are expressed in g $\cdot L^{-1}$.

Pulsed electric field treatments

HIPEF treatments were carried out using the batch pilot plant equipment manufactured by Physics International (San Leandro, CA) with a capacitor of 0.1 μF . The pulse waveform was exponentially decaying.

The treatment chamber was a parallel plate with a 1.5 cm electrode gap and a volume of 12.4 mL. Samples were treated at electric field intensities of 16.4, 18.5, 22.7 and 27.4 kV cm^{-1} . The number of pulses applied to the samples was 20, 40, 60 and 80, for which treatment times lasted 84.8, 154.7, 241 and 314.5 μs , respectively. These treatment times (t) were calculated from the product of the number of pulses (n) and the pulse width (τ) (Equation 1) coming from the capacitance of the equipment (C) and the resistance of the product in the treatment chamber (R) that varied from 42.4 to 39.3 Ω during treatment due to temperature increase (Equation 2). The temperature of each HIPEF treatment was controlled by a temperature probe (H9043, Hanna Instruments, Guipúzcoa, Spain) before and after treatment and never exceeded 35°C (from an initial value of 18 \pm 1 °C).

$$t = \sum (\tau_i \cdot n_i) \quad \text{Equation 1}$$

$$\tau = R \cdot C \quad \text{Equation 2}$$

Enzyme determination

Solutions

Prior to analyzing the lipase activity, a p-nitrophenyl caprylate (p-NPC) solution (0.005 M) was prepared adding 1326.50 mg of p-NPC (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) to 1000 mL of dimethyl sulfoxide (Riedel de Haën, Seelze, Germany). A pH 8.5 buffer was prepared mixing 250 mL of tris-hidroximethyl aminometane 0.2 M (Prolabo, Fontenay S/Bois, France) with 173 mL of HCl 0.1 M (Prolabo) and diluting with distilled water to 1000 mL.

Lipase activity determination

Lipase activity was quantified using a method described and validated by Bendicho, Trigueros, Hernández and Martín (2001). To run the analysis in SMUF, 50 μ L of p-NPC solution, 3 mL of pH 8.5 buffer and 400 μ L of the SMUF sample containing the enzyme were placed in a test tube. This mixture was incubated at 37°C for 30 min. in a thermostatic bath (Clifton ND-4, Nickel Electron LTD, Weston-Super-Mare, England). Finally, the mixture was transferred into cuvettes to read the absorbance at 412 nm in a spectrophotometer UV/Visible (CE 1021, CECIL, Cambridge, England).

Statistical analysis

Each processing condition was assayed in duplicate, as well as enzyme determination. Therefore, the results were averages of four measurements. Enzyme activity was expressed as relative activity [RA(%)] and computed using the following expression:

$$RA = 100 \cdot \frac{A_t}{A_o}$$

where A_t is the enzyme activity in the sample after treatment and A_o is the enzyme activity of the untreated sample.

All experimental values were adjusted to single exponential models related to the treatment time (Equation 3) or to the electric field intensity (Equation 4).

$$RA = RA_0 \cdot \exp(-k_E \cdot t) \quad \text{Equation 3}$$

$$RA = RA_0 \cdot \exp(-k_t \cdot E) \quad \text{Equation 4}$$

where RA_0 is the intercept of the curve (100% RA), k_E (μs^{-1}) and k_t ($cmkV^{-1}$) the first order kinetic constants, t the treatment time (μs) and E the electric field intensity ($kVcm^{-1}$).

Fitting of first order k -values to single linear (Equation 5) or exponential models (Equation 6) related to the treatment time or to the field strength were tried.

$$k = k_0 + \alpha \cdot x \quad \text{Equation 5}$$

$$k = k_1 \cdot \exp(-\beta \cdot x) \quad \text{Equation 6}$$

where k is the first order constant obtained from Equations 3 (k_E) and 4 (k_t); k_0 and k_1 are the intercept of the curves; α and β are linear and first-order constants, respectively; x is the field strength or the treatment time depending if the first-order constant is obtained from Equation 3 or Equation 4, respectively.

The results of enzyme inactivation were also related to treatment time and electric field intensity through two empirical models: the modified Hülshager's (Equation 7) and Fermi's equations (Equation 8) (Giner et al., 2000).

$$RA = 100 \cdot \left(\frac{t}{t_c} \right)^{\left(\frac{-(E-E_c)}{c} \right)} \quad \text{Equation 7}$$

where t_c (μs) and E_c ($kVcm^{-1}$) are the extrapolated critical t and E values and k an independent constant factor ($kVcm^{-1}$).

$$RA = \frac{100}{1 + \exp\left(\frac{E - E_h}{a}\right)} \quad \text{Equation 8}$$

where E_h ($kVcm^{-1}$) is a critical level of E where RA is 50%, and where the a parameter ($kVcm^{-1}$) indicates the steepness of the curve around E_h . Moreover, parameters E_h and a are exponential function of the treatment time (Peleg, 1995; Giner et al., 2000) (Equations 9 and 10).

$$E_h = k_h \cdot e^{\delta \cdot t} \quad \text{Equation 9}$$

$$a = k_a \cdot e^{\gamma \cdot t} \quad \text{Equation 10}$$

where k_h and k_a are the intercept of the curve, δ and γ the first order constants and t the treatment time.

Thus, Fermi's equation (Equation 11), obtained from Equation 8, 9 and 10 provides the combined effect of the treatment time and the field strength on the RA .

$$RA = \frac{100}{1 + \exp\left(\frac{E - k_h \cdot e^{\delta \cdot t}}{k_a \cdot e^{\gamma \cdot t}}\right)} \quad \text{Equation 11}$$

Experimental data were fitted to first-order kinetic models and to modified Hülshager's and Fermi's models by non-linear regression procedures of the Statgraphics plus 3.0 (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA, 1994-1997) ($P=0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

When the SMUF samples containing lipase were treated by HIPEF, it was observed that the enzymatic activity generally decreased with the electric field intensity and treatment time (Fig. 1). Maximum inactivation of 62.1% was achieved after a 314.5 μs -treatment at 27.4 kVcm^{-1} . This depletion is due to the effect of the electric field, since it is known that exposition of proteins to an electric field can cause changes on its conformation and so it makes enzymes loose their activity because the substrate cannot assemble with the active site (Tsong, 1990).

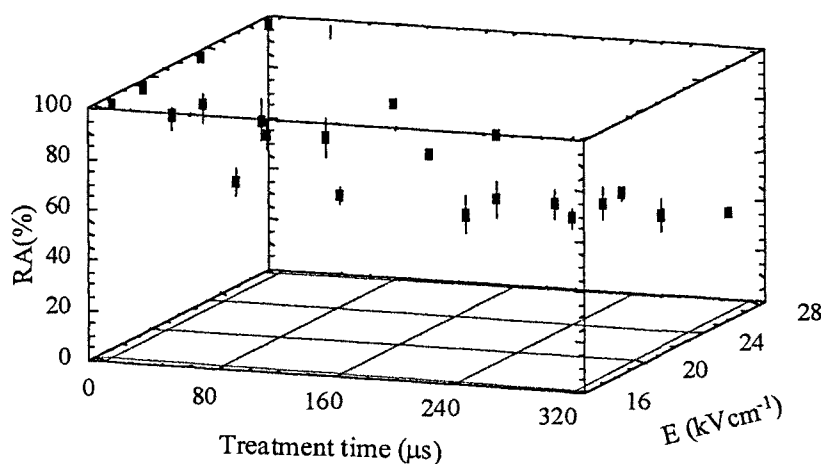


Figura 1. Effects of pulsed electric field treatments on lipase activity. RA(%) is the residual enzymatic activity after exposure to different conditions of treatment time and field strength (E).

First order kinetic models

In all the cases, RA(%) decreased exponentially ($R^2: 0.676-0.963$) with treatment time (Equation 3). The k_E values obtained in every first order adjustment increased linearly with electric field intensity (Equation 5) (Table 2). Results of that fitting showed a positive linear

dependence ($R^2=0.919$) between k_E and E . Thus, under these conditions, Equation 12 can describe the influence of E on k_E .

$$k_E = 2 \cdot 10^{-4} \cdot E - 0.001 \quad \text{Equation 12}$$

Table 2. Kinetic constants (k_E) of the residual lipase activity (RA) as a function of the treatment time according to a first-order kinetic models after HIPEF treatments on simulated milk ultrafiltrate (Equation 3).

Electric field intensity ($\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$)	k_E (μs^{-1})	R^2
16.4	0.0017	0.676
18.5	0.0015	0.938
22.7	0.0025	0.842
27.4	0.0032	0.963

As there is no specific literature about the inhibition kinetics of lipase or other milk enzymes by HIPEF, the results were compared to that obtained by Giner et al. (2000) and Giner et al. (2001a and 2001b) for vegetable enzymes. The kinetic behavior of lipase after HIPEF treatments related to treatment time agrees with that reported by Giner et al. (2000) and Giner et al. (2001b) for pectin methylesterase (PME) and polyphenoloxidase (PPO). These authors obtained k_E -values ranging from 0.036 to 0.35 ms^{-1} for PME using electric field intensities from 5 to 24 kVcm^{-1} , and k_E -values from 0.024 to 0.440 ms^{-1} for PPO using electric field intensities from 5.50 to 24.6 kVcm^{-1} , while for the evaluated lipase, k_E -values from 1.7 to 3.2 ms^{-1} were obtained. It shows that the vegetable PME or PPO are much more resistant to HIPEF than the evaluated lipase. The k_E -values obtained from the first-order adjustment matched with good agreement a linear model related to field strength (Equation 12, $R^2=0.919$). However, Giner et al. (2000) and Giner et al. (2001b) found that an exponential model better described the dependence of obtained k_E on E .

Higher electric field intensity corresponded to lower lipase activity. Several models were tried and, the first-order model was effective and accurate in describing the RA as a function of field strength at different treatment times (Equation 4). The exponential rate constant, k_t , ranged from 0.0134 to 0.030 cmkV^{-1} (Table 3). The variation in k_t as related to treatment time was well adjusted ($R^2=0.946$) to a linear model (Equation 5), resulting in Equation 13.

$$k_t = 8 \cdot 10^{-5} \cdot t - 0.0069 \quad \text{Equation 13}$$

Table 3. Parameter values of the first-order model used to describe the residual lipase activity (RA) in simulated milk ultrafiltrate exposed at high intensity pulsed electric fields (HIPEF) as related to the electric field intensity (Equation 4).

Treatment time (μs)	k_t ($\text{cm}\cdot\text{kV}^{-1}$)	R^2
84.8	0.0134	0.784
154.7	0.0179	0.955
241.0	0.0284	0.954
314.5	0.0300	0.902

As mentioned before, no kinetic studies on milk enzymes exist. In general, the effect of field strength has been less studied than the treatment time, although Giner et al. (2000) also proposed an exponential model to describe the inactivation of PME as a function of the field strength applied, and obtained k_t values in a range from 0.022 to 0.120 cmkV^{-1} after applying treatment times from 1 to 8 ms. The first-order rate constants for lipase ranged from 0.0134 to 0.030 cmkV^{-1} when applying treatment times from 84.75 to 314.45 μs . The model led to R-squared values ranging from 0.784 to 0.955, which showed the goodness of the model in predicting the inhibition of lipase as related to the supplied field strength. The rate constants (k_t) obtained from the first-order modeling were better when adjusted to a linear model related to treatment time (Equation 13, $R^2 = 0.946$). However, Giner et al. (2000) used an exponential model to describe the dependence of the treatment time on the k_t -values from the inactivation of PME.

Thus, Equations 14 (Fig. 2A, $R^2=0.889$) and 15 (Fig. 2B, $R^2=0.863$), the former from equations 3 and 12, and the latter from Equations 4 and 13 combine the effect of treatment time and electric field intensity on RA.

$$RA = RA_0 \cdot \exp[-(2 \cdot 10^{-4} \cdot E - 0.001)] \cdot t \quad \text{Equation 14}$$

$$RA = RA_0 \cdot \exp[-(8 \cdot 10^{-5} \cdot t - 0.0069)] \cdot E \quad \text{Equation 15}$$

Modified Hülsheger's model

First proposed to describe microbial destruction by HIPEF, Giner et al. (2000) used a modified Hülsheger model in terms of enzymatic inhibition (Equation 7). The model parameters were calculated and adjusted to the RA(%) values according to the different electric field intensities and treatment times. The data fit the model with good agreement (Fig. 2C, $R^2 = 0.867$) and the resulting values for E_c , t_c and k were 4.03 kVcm^{-1} , $31.08 \text{ }\mu\text{s}$, and 64.31 kVcm^{-1} , respectively (Equation 16).

$$RA = 100 \cdot \left(\frac{t}{31.08} \right)^{\frac{(E-4.03)}{64.31}} \quad \text{Equation 16}$$

Available data exist regarding Hülsheger's parameters for microorganisms, but the adjustment of enzyme inactivation to the model has only been studied for certain vegetable enzymes. PME begins inactivation at lower electric fields ($E_c=0.7 \text{ kVcm}^{-1}$) compared to the lipase studied in this case, but requires longer treatment time ($t_c=480 \text{ }\mu\text{s}$); the k value (39 kVcm^{-1}) was also lower than that of lipase (Giner et al., 2000). Other enzymes such as polyphenoloxidases (Giner et al., 2001a) lead to E_c , t_c and k values in a range of $0-2.4 \text{ kVcm}^{-1}$, $300-800 \text{ }\mu\text{s}$ and $70-116 \text{ kVcm}^{-1}$, respectively. In general, microorganisms lead to higher values of E_c , but lower t_c and k values. Martín, Qin, Chang, Barbosa-Cánovas and Swanson (1997) obtained E_c values ranging from 12.34 to 14.62 kVcm^{-1} for *E. coli* in milk when treatments were performed in continuous mode equipment, and slightly higher E_c (18.7 to 20.4 kVcm^{-1}) when treatments were carried out in batch mode. Also, in milk, Sensoy, Zhang and Sastry (1997) obtained an E_c value of 12.57 kVcm^{-1} for *Salmonella dublin*. Regarding the t_c -value, Sensoy, Zhang and Sastry (1997), while using a continuous mode treatment, obtained a t_c from 10.18 to $11.61 \text{ }\mu\text{s}$, much lower than that mentioned for the considered lipase. On the other hand, the k -value obtained for lipase was much higher than the range mentioned for bacteria in skim milk from $2.2-9.5 \text{ kVcm}^{-1}$ (Martín, Qin, Chang, Barbosa-Cánovas & Swanson, 1997; Sensoy, Zhang & Sastry, 1997). The large value for the kinetic constant (k) indicates a wide span in the inactivation rate curve. On the contrary, the smaller values obtained for microorganisms implies a steep decline or high microbial inactivation rate. Therefore, for both enzymes and microorganisms, the smaller the k -value, the higher the susceptibility to HIPEF.

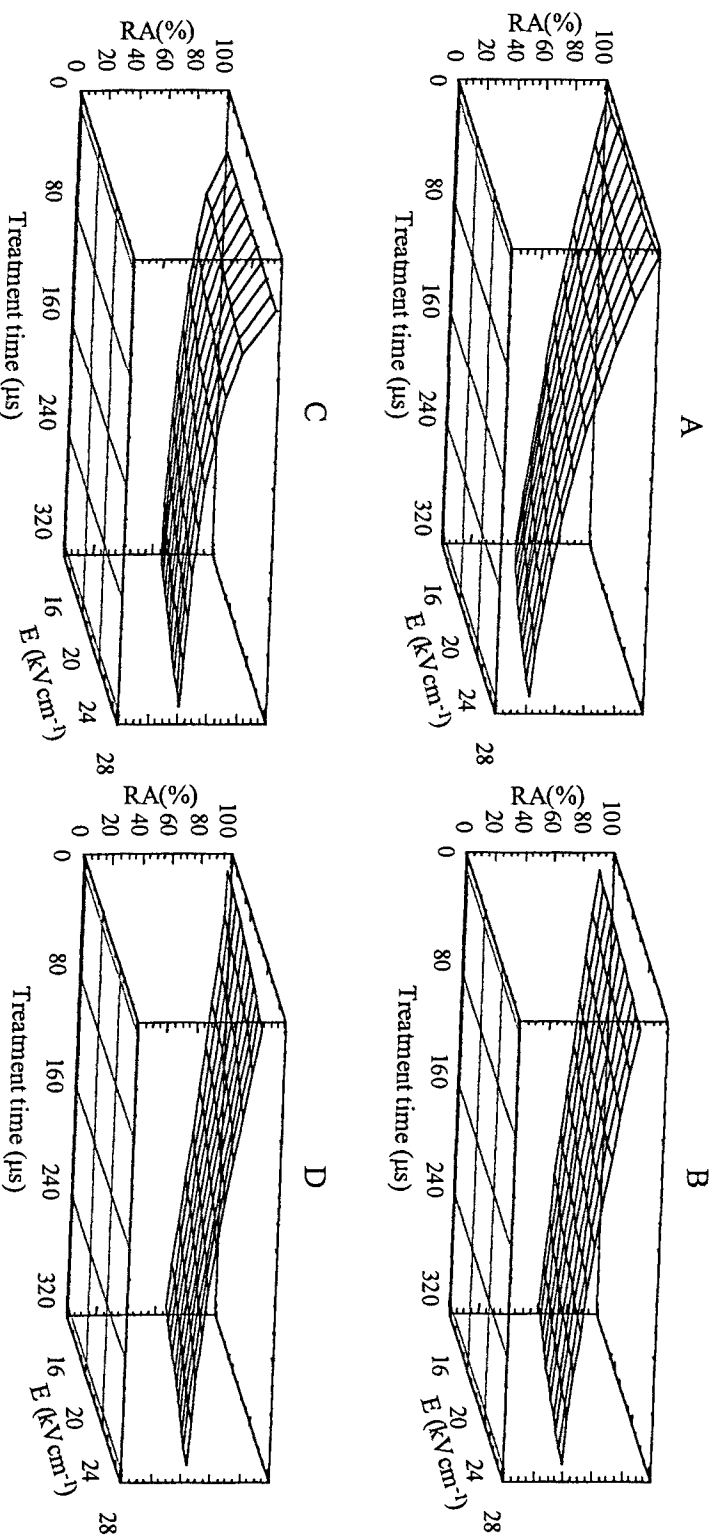


Fig. 2. Three-dimensional plots of the residual lipase activity (RA%) versus the field strength (E) and the treatment time that held the evaluated models: A) Exponential (Equation 14) ; B) Exponential (Equation 15); C) Hülshöger (Equation 16); D) Fermi (Equation 17). The treatment times applied were up to 314.5 μ s and the electric field intensities ranged from 16.4 to 27.4 kV/cm.

Modified Fermi's model

Experimental data (RA%) also could be fitted to modified Fermi's model (Equation 11) by non-linear regression. Fermi's equation as a function of both electric field intensity and treatment time (Equation 17) showed and R^2 of 0.833 (Fig. 2D).

$$RA = \frac{100}{1 + \exp\left(\frac{E - (40.43 \cdot e^{-0.0015t})}{7.21 \cdot e^{0.002}}\right)} \quad \text{Equation 17}$$

The value of E_h decreased with the increase of the treatment time from 35.60 kVcm^{-1} at 84.8 μs to 25.22 kVcm^{-1} at 314.5 μs . On the contrary, a increased with the treatment time from 8.57 kVcm^{-1} to 13.69 kVcm^{-1} for the same range of treatment time times.

There are few references available that describe enzymatic inhibition by HIPEF using Fermi's model. Giner et al. (2000) obtained similar values on PME to those obtained with lipase. Giner et al. (2000) after 50 and 100 pulses observed that E_h took values of 28 and 20 kVcm^{-1} respectively and the steepness parameter was 11 and 9 kVcm^{-1} , respectively, and concluded that both E_h and a fitted to an exponential model related to the applied number of pulses.

As far as enzymes is concerned, no further adjustments to Fermi's model have been found, but several authors have described the microbial destruction using this model; actually, this model was initially described for microorganisms (Peleg, 1995). Sensoy, Zhang and Sastry (1997) also used the model to adjust the results of *Salmonella dublin* inactivation in skim milk to the electric field intensity, and found that the kinetic parameters for both a and E_h were lower than that obtained for lipase. Thus, for *S. dublin*, they obtained a values ranging from 2.83 to 6.58 kVcm^{-1} and E_h values from 16.24 to 12.64 kVcm^{-1} at treatment times from 100 to 25 μs . It has also been observed after an 80-pulse treatment on lipase that the intercept of both E_h (25.22 kVcm^{-1}) and a (13.69 kVcm^{-1}) are even higher than intercepts obtained by Peleg (1995) from the original data on *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* I, and *Pseudomonas aeruginosa* (Hülshager, Potel & Niemann, 1983) after a 2 pulse-treatment in buffer solution. Thus, research on lipase led to larger values for E_h and a as opposed to microorganisms, indicating that this enzyme is more resistant to HIPEF than the mentioned microorganisms. In both cases, Peleg (1995) and Sensoy, Zhang and Sastry (1997) proposed exponential kinetics to model the evolution of a and E_h with treatment time, as in the case of the evaluated lipase.

In conclusion, all the evaluated models can describe the inactivation of lipase by HIPEF with good accuracy (R^2 :0.833-0.889) and each one supplies different information. Since, the first-order models just describe enzyme inactivation, whereas the other models introduce constants that express the easiness or difficulty to inactivate the enzyme and the way in which the enzyme destruction occurs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the *Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT)* of Spain for supporting the work included in Project ALI97 0774, and to the *Ministerio de Educación, Cultura y Deportes* for financial support granted to Silvia Bendicho throughout her Doctoral studies.

REFERENCES

- Andersson, R. E., Danielsson, G., Hedlund, C. B., & Svensson, S. G. 1981. Effect of heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. *Journal of Dairy Science*, 64, 375-379.
- Arántegui, J., Marín, E., Rosell, J. R., & Martín, O. 2000. A mathematical model for the inactivation of *Lactobacillus brevis* by pulsed electric fields. 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods, Leuven, Belgium.
- Bendicho, S., Espachs, A., Stevens, D., Arántegui, J., & Martín, O. 1999. Effect of High Intensity Pulsed Electric Fields on Vitamins of Milk. European Conference of Emerging Food Science and Technology, Tampere, Finland.
- Bendicho, S., Estela, C., Fernández-Molina J. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2001. Effect of high intensity pulsed electric fields on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. III Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Valencia, Spain.
- Bendicho, S., Martí, G., Fernández-Molina, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2001. Effect of high intensity pulsed electric fields on a protease from *Bacillus subtilis*. Annual IFT Meeting, Institute of Food Technologists, New Orleans, Louisiana.
- Bendicho, S., Trigueros, M. C., Hernández, T., & Martín, O. 2001. Validation and comparison of analytical methods based on the release of p-nitrophenol to determine lipase activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 84, 1590-1596.
- Calderón-Miranda, M. L., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 19-30.
- Castro, A.J. 1994. Pulsed electric field modification of activity and denaturation of alkaline phosphatase. Ph.D. thesis, Washington State University, Pullman, Washington.
- Cogan, T. M. 1977. A review of heat-resistant lipases and proteinases, and the quality of dairy products. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 1, 95-105.
- Cousin, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, 45, 172-207.
- Deeth, H. C., & Fitz-Gerald, C. H. 1983. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In *Dairy Chemistry – 2: Lipids* ed. Fox, P. F. Pp. 195-239. Barking: Applied Science Publishers.
- Giner-Seguí, J., Rauret-Ariño, A., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín-Belloso, O. 1997. Inactivation of polyphenoloxidase by pulsed electric fields. IFT Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Orlando, Florida.
- Giner, J., Gimeno, V., Espachs, A., Elez, P., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2000. Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 57-67.
- Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2001a. Inactivation of pear and peach polyphenoloxidase by pulsed electric fields. In J. Welte-Chanes, G.V. Barbosa-Cánovas, J.M. Aguilera, L.C. López-Leal, P. Wesche-Ebeling, A. López-Malo,

- and E. Palou-García, Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food, (Vol II, pp. 1489-1493), Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc.
- Giner, J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O. 2001b. Effects of pulsed electric fields processing on apple and pear polyphenoloxidases. *Food Science and Technology International*, 7, 339-345.
- Hülshager, H., Potel, J., & Niemann, E. G. (1983). Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 22, 149-162.
- Jeness, R., & Koops, J. (1962). Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 16, 153-164.
- Lawrence, R. C. (1967). Microbial lipases and related esterases. Part II. Estimation of lipase activity. Characterization of lipases. Recent work concerning their effect on dairy products. *Dairy Science Abstracts*, 29, 59-70.
- Martín, O., Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Engineering*, 20, 317-336.
- Michalac, S. L., Álvarez, V. B., & Zhang, Q. H. (1999). Microbial reduction in skim milk using pulsed electric field technology. IFT Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Chicago, Illinois.
- Muir, D. D., Philips, J. D., & Dagleish, D. G. (1979). The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *Journal of the Society of Dairy Technologists*, 32, 19-23.
- Peleg, M. (1995). A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 93-99.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995a). High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 35, 101-107.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995b). Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Research International*, 28, 167-171.
- Richard, J. (1981). Classification adansonienne et identification de *Pseudomonas* psychrotrophes isolés du lait cru conservé à basse température. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)* 132A, 171-182.
- Sensoy, I., Zhang, Q., & Sastry, S. K. (1997). Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field. *Journal of Food Processing and Engineering*, 20, 367-381.
- Tsong, T. Y. 1990. Electrical modulation of membrane proteins: Enforced conformational oscillations and biological energy and signal transductions. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19:83-106.
- Vega-Mercado, H., Powers, J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995). Plasmin inactivation with pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 60, 1143-1146.
- Vega-Mercado, H., Powers, J.R., Martín-Belloso, O., Barbosa-Cánovas, G.V., Luededeche, L., & Swanson, B. G. (2001). Change in susceptibility of proteins to proteolysis and the inactivation of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 when exposed to pulsed electric fields. In G.V. Barbosa-Cánovas and Q. H. Zhang, *Pulsed electric fields in food processing: Fundamental aspects and applications* (Chapter 7). Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc.

Capítulo 5

High intensity pulsed electric fields and heat treatments on a protease from *Bacillus subtilis*. A comparison study with multiple systems

S. Bendicho, G. V. Barbosa-Cánovas and O. Martín

Journal of Food Engineering (submitted)

ABSTRACT

The effects of several thermal treatments and high intensity pulsed electric field (HIPEF) processing on a protease from *B. subtilis*, suspended in simulated milk ultrafiltrate (SMUF) and milk, were evaluated using different systems. This protease did not show high resistance to current thermal treatments since, in milk, a high reduction of protease activity was achieved by both high and low pasteurization treatments. The enzyme was more resistant to heat when suspended in SMUF. HIPEF slightly affected the activity of the studied protease when applying treatments of up to 500 kJ/l, using a batch apparatus (UdL-B) or two continuous-flow devices (UdL-C and WSU-C). No significant variation of the protease activity was observed after subjecting the samples to UdL-B or to UdL-C treatments. When HIPEF treatments were applied with the WSU-C equipment, enzyme activity varied from a slight inactivation when suspended in SMUF, to some enhancement of enzyme activity when suspended in milk.

Keywords: High intensity pulsed electric fields, heat, protease, milk, simulated milk ultrafiltrate.

INTRODUCTION

From the standpoint of spoilage, the major concern in the production of sterile milk is the destruction of heat-resistant bacterial spores. Another important point to take into consideration for establishing the shelf-life of milk is the active production of proteases and lipases from different bacteria (Adams et al., 1975; Braun et al., 1999), especially those that come from psychotrophic microorganisms. These enzymes can be heat-resistant, causing equally significant (or even more important) shelf-life problems than the bacteria or spores themselves (Adams et al., 1975; Griffiths et al., 1981).

B. subtilis is a psychotrophic bacteria, difficult to exclude from raw milk, that may grow and produce proteolytic enzymes during the refrigerated storage of raw milk. If these proteases survive milk sterilization treatments, the shelf-life of sterile milk could be greatly reduced. The development of bitter flavor, as well as coagulation or gelation in sterile milk, can be caused by these heat-resistant proteases (Adams et al., 1975).

HIPEF is a nonthermal process that involves applying very short electric pulses (μs) at high electric field intensities. Temperature is kept moderated during the process in order to destroy the microorganisms, maintaining the food's fresh-like qualities, and causing little depletion in the hydro- or liposoluble vitamin content (Calderón-Miranda et al., 1999; Bendicho et al., 2002b). HIPEF destroys microorganisms in both milk and simulated milk ultrafiltrate (SMUF) (Zhang et al., 1994; Pothakamury et al., 1995a and 1995b; Dunn and Pearlman 1987; Martín et al., 1997; Michalac et al. 1999). There are, however, few studies about HIPEF's effect on microbial milk enzymes. With electrohydraulic treatment, Gilliland and Speck (1967) achieved significant inactivation of a protease from *Bacillus subtilis* in a buffer solution. Vega-Mercado et al. (2001) reached up to 60% inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens* in milk using a continuous-flow HIPEF system. Another microbial enzyme that has been studied suspended in SMUF is lipase. The effect of HIPEF treatments on a lipase from *Pseudomonas fluorescens* suspended in SMUF was studied, using one continuous and one batch system. Inactivation of up to 62% was reported for a batch mode treatment, but just 13% inactivation was reached with a continuous-flow process (Bendicho et al., 2002a). Inactivation of lipase followed single exponential models related to the treatment time or the field strength, and also corresponded with the equations of Hülshager (Hülshager et al. 1983) and Fermi (Peleg, 1995) (Bendicho et al., 2002c).

The purposes of this work were to study and compare the effects that HIPEF and thermal treatments cause on the activity of a protease from *Bacillus subtilis* inoculated in SMUF or milk. Besides studying the effects of several heat processes, including high and low pasteurization, the effects of several HIPEF treatments on the activity of this enzyme were evaluated using different equipment (one batch and two continuous systems). To enable the comparison among the effectiveness of HIPEF treatments, processes of similar energy density were applied to all of them.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

This study was performed with simulated milk ultrafiltrate (SMUF) and skim milk. SMUF is a salt solution whose composition is similar to milk ultrafiltrate (Jeness and Koops, 1962) (Table 1). Skim milk was supplied by Granja Castelló, S.A (Mollerusa, Lleida, Spain).

The evaluated protease from *Bacillus subtilis* was purchased in its liquid commercial form (Aldrich, Steinheim, Germany). According to the supplier information, it had an activity of 728 U/ml.

Prior to applying the treatments, milk or SMUF samples with 50 mU/ml of protease were prepared.

Table 1. Composition of simulated skim milk ultrafiltrate (SMUF)[†] (Jeness and Koops, 1962).

Lactose	50.00
Potassium phosphate	1.58
Tri-potassium citrate	0.98
Potassium sulphate	0.18
Tri-sodium citrate	1.79
Calcium chloride dehydrate	1.30
Magnesium citrate	0.38
Potassium carbonate	0.3
Potassium chloride	1.00

[†]The values are expressed in g/l.

Thermal treatments

Several heat treatments, including high (75°C-15 sec) and low (63°C-30 min) pasteurization, were applied to SMUF and milk to use as reference values (Table 2). Samples were placed in 5-ml test tubes and heated at pre-selected temperatures (50, 55, 63, and 75°C) in a thermostatic bath (Clifton ND-4, Nickel Electron LTD, Weston-Super-Mare, England). Sample temperature was measured with an immersed probe. Aliquots of the samples were removed at specified intervals (Table 2) and cooled with ice until activity determination.

Table 2 Experimental conditions for heat treatment

Temperature (°C)	Time (min)
50	5, 10, 15, 20, 30
55	5, 10, 15, 20, 30
63	5, 10, 15, 20, 30
75	0.25, 0.5, 1, 3, 5, 10

Pulsed electric field treatments

Pulse treatments were applied using three different facilities: one batch apparatus and two continuous systems. Similar treatments in terms of energy density (500 kJ/l) were applied to the samples to enable the comparison of effectiveness of the equipments.

Batch mode treatments

The batch mode HIPEF apparatus (UdL-B) was located in the pilot plant of the Food Technology Department of the University of Lleida. The pulser was manufactured by Physics International (San Leandro, CA, USA), and it released exponential decaying pulses from a capacitor of 0.1 μ F. The treatment chamber was of stainless steel parallel plates, with a 1.5 cm electrode gap and a capacity of 12.4 ml (Figure 1)

HIPEF treatments of electric field intensities of 16.4, 18.5, 22.7, and 27.4 kV/cm, and up to 80 pulses of 4 μ s, were applied to the samples. The temperature of the samples was measured before and immediately after the treatments with a temperature probe. The temperature, initially at 20°C, never exceeded 34°C.

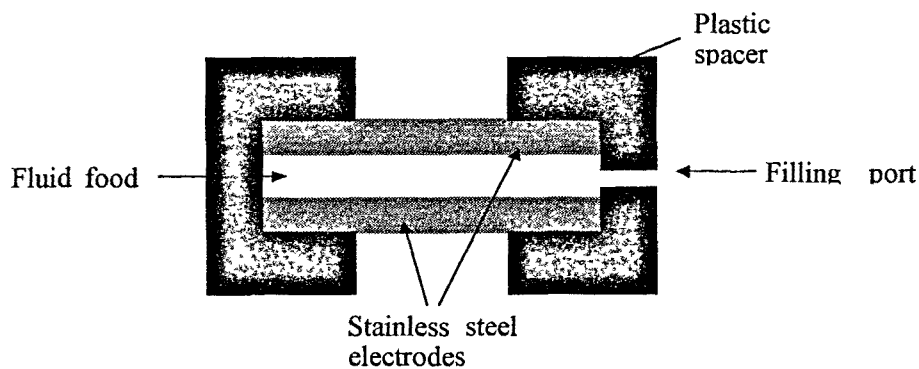


Figure 1. Scheme of the static chamber designed at the University of Lleida

Continuous flow treatments

One continuous system (UdL-C) was located at the University of Lleida, and consisted of a bench scale device (OSU-4F, Ohio State University, Columbus, OH, USA). The equipment was set up to release positive, monopolar, square-wave pulses of 4 μ s.

The treatment chamber device consisted of eight co-linear chambers disposed in a series; each one contained two stainless steel electrodes, with a gap of 0.29 cm and a treatment volume of 0.012 cm³ (Figure 2)

The treatment flow rate was 60 ml/min and it was controlled by a variable speed pump (model 752210-25, Cole Palmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA). The product was refrigerated in the space provided between the chambers by means of ice water.

Samples were subjected to processes of up to 22 pulses at field strengths of 19.7, 23.7, 27.6, 31.6, and 35.5 kV/cm, and at a pulse frequency of 66.66 Hz. The temperature of the entrance and exit of the treatment chamber was measured with a thermocouple; the final temperature never exceeded 40°C.

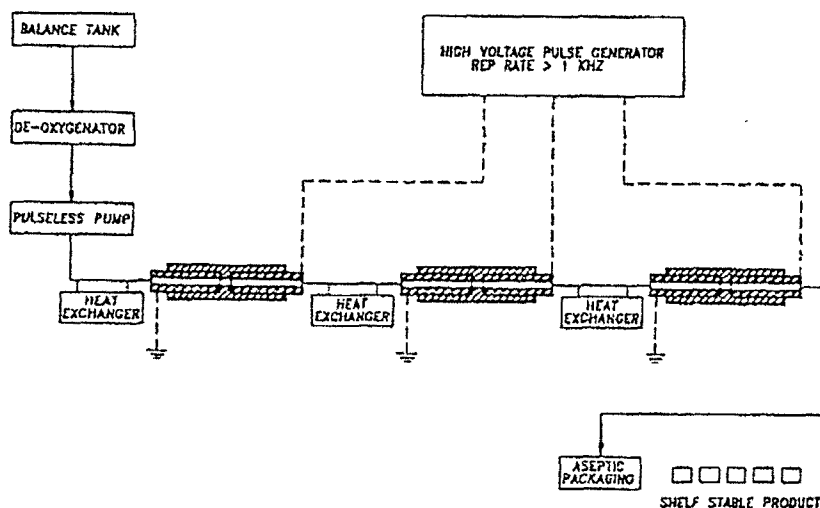


Figure 2. A cross-sectional view of the modified coaxial treatment chamber designed, constructed, and tested for microbial inactivation at WSU (Martin-Belloso et al., 1997).

The other continuous equipment (WSU-C) was installed at Washington State University. It consisted of a pilot plant high intensity electric field pulser, manufactured by Physics International (San Leandro, CA, USA), which released pulses of exponential decaying waveform. This continuous HIPEF system had a 0.5 μ F capacitor and a coaxial treatment chamber containing two stainless steel electrodes, with a gap of 0.67 cm and a volume of 30.56 cm³ (Figure 3). The electric field intensities applied were 26.1, 30.5, and 37.3 kV/cm. Frequencies 2 and 4 Hz were tested, and treatments of up to 89 pulses with a width of 1.7 μ s were applied. The flow rate of SMUF was 500 ml/min, controlled by a variable speed pump (Masterflex 7654-00, Cole Palmer Instruments Co., Chicago, IL). A

cooling coil immersed in ice water was used to cool the product at the entrance and exit of the treatment chamber. The temperature of the entrance and exit was recorded with a digital thermometer; the maximum outlet temperature was 35°C.

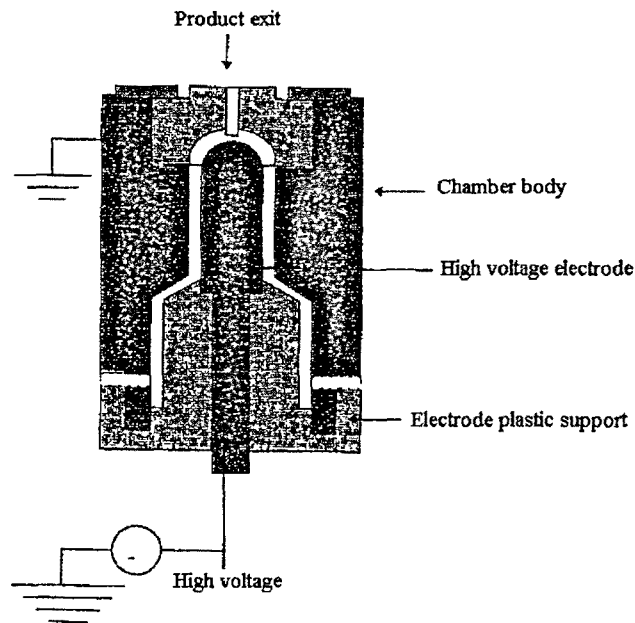


Figure 3. Scheme of the UdL continuous equipment (OSU-4F, Ohio State University, Columbus, OH, USA).

The input energy densities supplied (Q , J/l) for each HIPEF treatment can be computed using Equation 1 for exponential pulses, and using Equation 2 for square-wave pulses.

$$Q = \frac{V_0^2 \cdot C \cdot n}{2 \cdot v} \cong \frac{V_0 \cdot I \cdot \tau \cdot n}{2 \cdot v} \quad \text{Equation 1}$$

$$Q = \frac{V_0^2 \cdot C \cdot n}{v} \cong \frac{V_0 \cdot I \cdot \tau \cdot n}{v} \quad \text{Equation 2}$$

where V_0 is the peak voltage (V), C the capacitance of the capacitor (F), I the intensity of the current (A), τ the pulse width, n the number of pulses, and v the volume of the treatment chamber (l).

Enzyme determination

Reagents

Azocasein was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sodium dihydrogenphosphate, disodium hydrogenphosphate, and trichloroacetic acid were from Prolabo (Fontenay S/Bois, France).

Solutions

Prior to running the analysis to determine protease activity, a pH 7.2 buffer solution was prepared by mixing 36 ml of sodium hydrogenphosphate 5 mM with 14 ml of sodium dihydrogenphosphate 5 mM, and diluting with distilled water until 1000 ml. This buffer was used to prepare a 1% azocasein solution. A 5% aqueous solution of trichloroacetic acid was also required.

Protease activity determination

Ewings et al. (1984) described the assay for proteolytic activity using azocasein as substrate, and it has been validated for its use in SMUF and skim milk by Bendicho et al. (2002d). It consisted of combining 1 ml of the azocasein solution with 100 μ l of the sample containing the enzyme. The contents of the tubes were mixed and incubated at 35.5 °C for 15 min. The reaction was ceased by the addition of 2 ml of 5% TCA. The absorbance of the supernatant fraction was read at 345 nm in a spectrophotometer UV/Visible (CECIL, CE 1021, England, UK).

Statistics

Each processing condition was assayed in duplicate, and enzyme determination was also performed in duplicate; therefore, the results were the averages of four measurements. Enzyme activity was expressed as residual relative activity [RA(%)] computed using Equation 3. The percentage of enzyme inactivation [I(%)] can be calculated using Equation 4.

$$RA(\%) = 100 \cdot \frac{A_t}{A_o} \quad \text{Equation 3}$$

$$I(\%) = 100 - RA \quad \text{Equation 4}$$

where A_t is the enzyme activity in the sample after treatment and A_o is the enzyme activity of the untreated sample, which was determined immediately after processing to avoid the effect of storage time.

Analysis of variance was used to determine significant differences among the treatments ($p=0.05$), and was performed by Statgraphics Plus for Windows version 3.0 package (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, USA, 1994-1997).

The reduction of enzyme activity as a function of treatment time for each thermal treatment was adjusted to a first-order kinetic model related to the treatment time (Equation 5). Moreover, the Arrhenius model was used to adjust the k_T -values to the treatment temperature (Equation 6).

$$RA = RA_0 \cdot e^{-k_T \cdot t} \quad \text{Equation 5}$$

$$k_T = k_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Equation 6}$$

where RA_0 is the intercept of the curve (100%), k_T the first-order constant for each evaluated temperature (min^{-1}), t the treatment time (min), E_a the energy of activation (J/mol), R the constant of the ideal gases ($8.31 \text{ J}^\circ\text{K}\cdot\text{mol}$), and T the treatment temperature ($^\circ\text{K}$).

As regards HIPEF treatment, decrease of enzyme activity was fitted to a first-order model related to the input energy density (Equation 7).

$$RA = RA_0 \cdot e^{-k_Q \cdot Q} \quad \text{Equation 7}$$

where k_Q is the first-order constant (1/J) and Q the input energy density (J/l).

RESULTS AND DISCUSSION

Thermal treatments

After subjecting the samples of SMUF and milk to thermal treatments, it was observed that the activity of the protease from *Bacillus subtilis* decreased with the increase of the treatment time and temperature applied. Processing the samples at 50 and 55°C, a slight decrease in enzyme activity was observed in both cases (SMUF and milk), whereas at conditions of low pasteurization (63°C-30 min), near-complete inactivation of the enzyme was achieved in both SMUF and milk. When a high pasteurization treatment was applied (75°C-15 s), an inactivation of only 7% was reached in SMUF, showing the high resistance of this protease to high thermal pasteurization when suspended in SMUF; much longer heat treatments were required (75°C-5 min) to achieve complete destruction of the enzyme in SMUF. However, this thermal treatment achieved an almost complete inactivation of the enzyme suspended in milk. In this case a reduction of up to 96% was attained, so the susceptibility of the evaluated protease was higher in milk than in SMUF at this temperature ($P < 0.05$).

No significant differences ($P < 0.05$) were observed between the enzyme inactivation obtained in SMUF and milk at most of the temperatures evaluated (50, 55, and 63°C); only the inactivation in SMUF at 75°C differed significantly ($P < 0.05$) from those obtained in milk. For both, milk and SMUF, results indicated that after any thermal treatment, protease activity decreased with the increase of temperature or treatment time (Figure 4). The values of $RA(\%)$ as a function of heat treatment time were adjusted to a first-order kinetic model (Equation 5) ($P < 0.05$). The model displayed a high determination coefficient (R^2), which varied from 0.831 to 0.992 (Table 3). The first-order kinetic constant values (k_T) ranged from 0.004 to 8.48 min^{-1} , and the increase in treatment temperature involved an exponential raise in the first-order k_T values. Under the evaluated conditions, the influence of temperature (T) on k_T could be described by the Arrhenius equation (Equation 6) in both

SMUF (Equation 8, $R^2=0.977$) and milk (Equation 9, $R^2=0.968$). The activation energy (E_a) obtained in this range (50-75°C) was 209.5 kJ/mol for SMUF and 296.8 kJ/mol for milk.

$$k = 3 \cdot 10^{31} \cdot e^{\left[\frac{-209.5}{(8.31 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right]} \quad \text{Equation 8}$$

$$k = 2 \cdot 10^{45} \cdot e^{\left[\frac{-296.8}{(8.31 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right]} \quad \text{Equation 9}$$

The E_a obtained in milk was higher than that of SMUF, showing that enzyme activity decreased with the treatment temperature faster in milk than in SMUF. Both E_a are higher than that of another microbial enzyme, such as a lipase from *Pseudomonas fluorescens* in SMUF ($E_a=134.48$ kJ/mol) (Bendicho et al., 2002a).

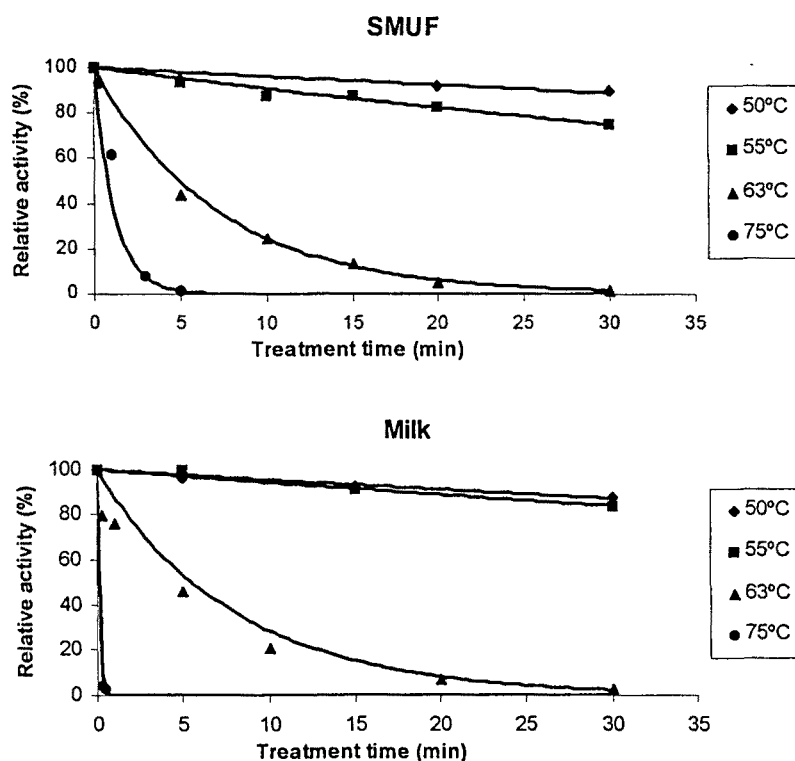


Figure 4. Inhibition of relative protease activity (RA) exposed to different thermal treatments. Treatments were performed in skim milk and in SMUF at 50 (◆), 55 (■), 63 (▲) and 75 (●).

Table 3 First order rate constant (k_T) and determination coefficient (R^2) of the inhibition of relative protease activity as a function of the time of heat treatment

Product [†]	Treatment temperature (°C)	k_T (min ⁻¹)	R^2
SMUF	50	0.004	0.831
SMUF	55	0.0096	0.958
SMUF	63	0.1393	0.992
SMUF	75	0.873	0.988
Milk	50	0.0045	0.979
Milk	55	0.0058	0.956
Milk	63	0.1250	0.979
Milk	75	8.48	0.956

[†]SMUF, simulated skim milk ultrafiltrate

HIPEF treatments

It has been observed that HIPEF treatment hardly reduces the activity of this protease at the assayed conditions. This enzyme was quite resistant to all the evaluated HIPEF processes, whether suspended in SMUF or in milk and whatever the equipment used. Treatments of up to 500 kJ/l using the UdL-B or UdL-C equipments did not cause any change in enzyme activity. Only the samples processed by the WSU-C equipment suffered a slight variation of the enzyme activity that depended on the electric field intensity, number of pulses, pulse repetition rate, energy density applied, and the medium containing the enzyme.

In SMUF, when treatments with the WSU-C system were carried out at 2 Hz, no significant variation of enzyme activity was observed after 84 pulses at 26.1 kV/cm, whereas, applying the same number of pulses, a similar decrease of 12% was reached at 30.5 and 37.3 kV/cm. On the other hand, SMUF samples processed at 4 Hz led to similar results of inactivation at all field strengths evaluated: protease activity decreased with the number of pulses until 13% (Figure 5).

The effects of HIPEF on protease activity in milk using the WSU-C equipment varied from no significant variation of enzyme activity to a slight enhancement of protease activity, depending on the field strength and frequency applied. For treatments carried out at 2 Hz, it was observed that the activity of protease in milk was enhanced up to 10 to 15% after applying HIPEF at any of the field strengths evaluated, leading to a similar variation in all cases (Figure 6). It should be noted that no variation on the protease activity was observed after applying the treatments at 4 Hz (Figure 6).

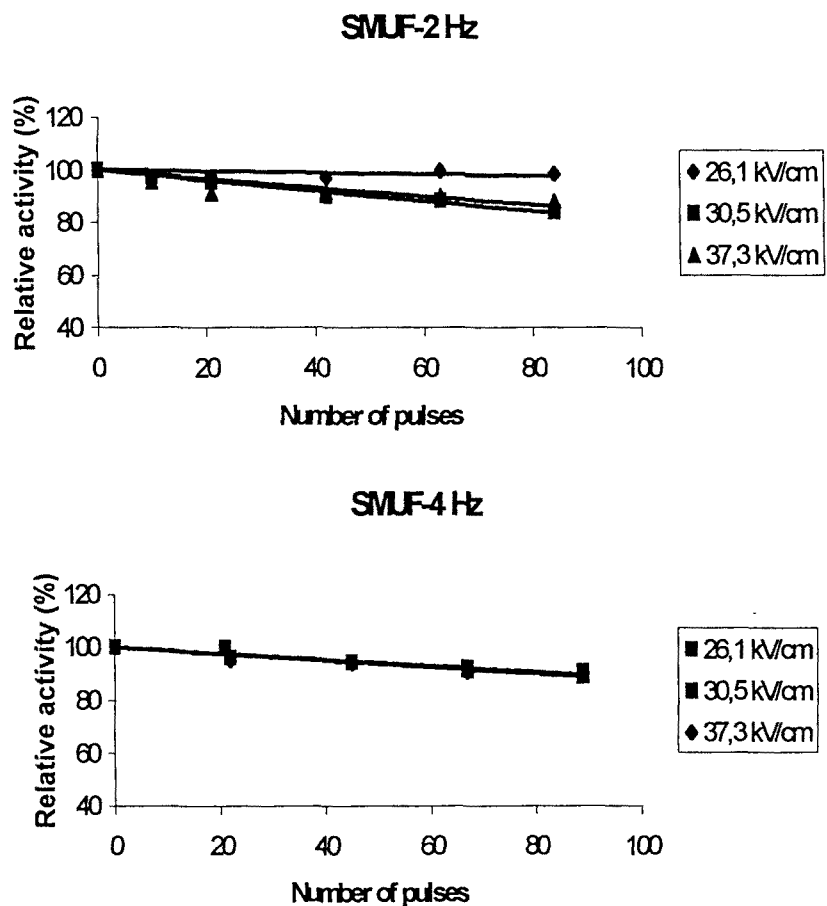


Figure 5. Inhibition of relative protease activity (RA) in SMUF exposed to 2 and 4-Hz high intensity pulsed electric field treatments in the continuous WSU-C equipment. Treatments were performed at 26.1 (◆), 30.5 (■) and 37.3 kV/cm (▲).

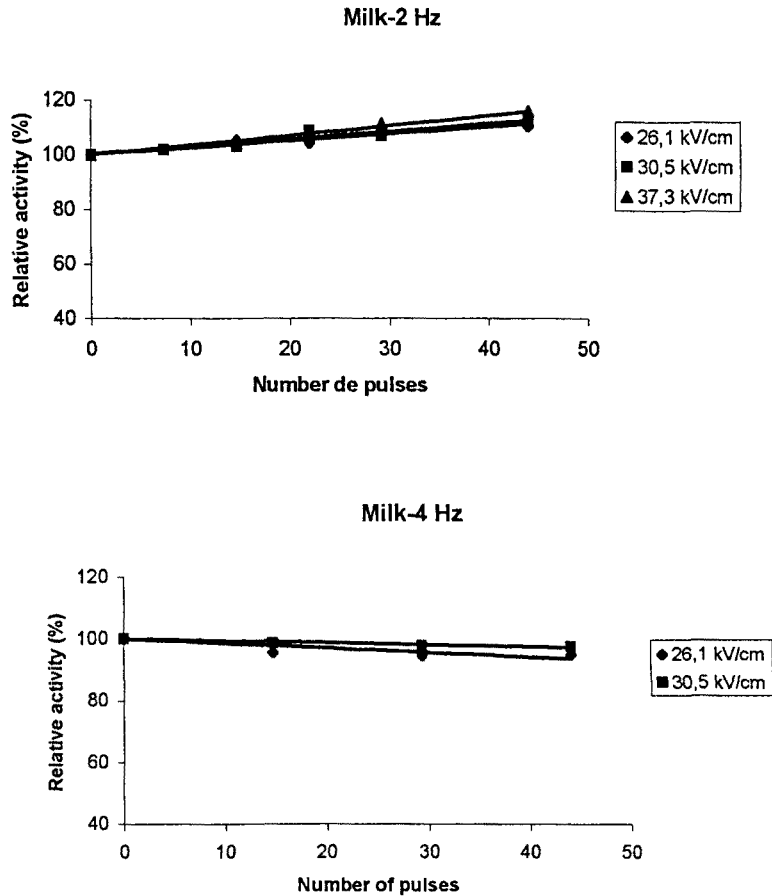


Figure 6. Inhibition of relative protease activity (RA) in skim milk exposed to 2 and 4-Hz high intensity pulsed electric field treatments in the continuous WSU-C equipment. Treatments were performed at 26.1 (◆), 30.5 (■) and 37.3 kV/cm (▲).

High resistance to HIPEF, or even an enhancement of the enzyme activity, has also been observed for other enzymes, such as alkaline phosphatase, pepsin, lactoperoxidase, or a lipase from *P. fluorescens* (Ho et al., 1997; Van Loey et al., 2002; Bendicho et al., 2002a). The differences among the results obtained using different devices were also observed in another enzyme by Bendicho et al. (2002a), who reported significant differences in the inactivation of a lipase from *Pseudomonas fluorescens* in SMUF using a batch (UdL-B), or a continuous-flow treatment (WSU-C). However, that lipase showed an opposite behavior to the studied protease, since inactivation of up to 62.1% was achieved using the batch mode treatment, and just 13% of activity was reduced using the WSU-C equipment.

The results of enzyme variation also depended on the media in which the enzyme was suspended. Although some inactivation was observed after subjecting samples of SMUF to the WSU-C process, similar treatments applied to milk enhanced the activity of the enzyme. Vega-Mercado et al. (2001) also reported differences between the results obtained after applying HIPEF treatments to different media. In milk, their results varied from 60% inactivation to enzyme activation, depending on the HIPEF conditions applied, as mentioned before; in a casein solution, however, they did not obtain any significant change in the enzyme activity after treatments of 31.6 or 23.3 kV/cm at up to 32 pulses. The results obtained were very different when the enzyme was suspended in a tryptic soy broth/yeast extract mixture, where a reduction of up to 80% was attained after a HIPEF treatment of 20 pulses at 18 kV/cm.

To compare the effectiveness of the equipments, the energy required for each HIPEF treatment was considered. Protease inactivation was also related to the energy density input. Energy densities supplied to the samples in all the different HIPEF experimental conditions were calculated from Equation 1 or 2. The treatments applied with the UdL-B and the UdL-C equipment did not cause variation in protease activity in either milk or SMUF, so no models could be tested to relate the RA to the energy density inputs. Only the treatments using the WSU-C equipment held results that showed significant differences. In this case, when protease was suspended in SMUF, its activity decrease could be fit to Equation 7 (Figure 7a, $R^2=0.621$), where the first-order constant took a value of 0.0003 l/kJ. When milk was treated using the WSU-C equipment, the results of RA varied from little inactivation, to even a slight activation of the enzyme for the same values of energy density input, depending on the pulse frequency. In that case, the results could not be fit to any model.

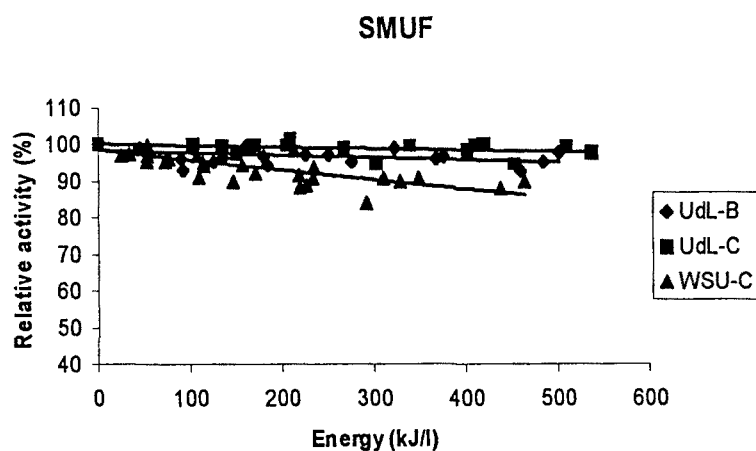


Figure 7. Relative protease activity (RA) in SMUF and skim milk exposed to different inputs of electric energy densities (Q) supplied by high intensity pulsed electric fields (HIPEF) treatments in batch (UdL-B, \blacklozenge) or continuous mode (UdL-C, \blacksquare ; WSU-C, \blacktriangle). Plotted lines are exponential decay fits.

Other authors reported considerable levels of inactivation of other microbial enzymes at similar or lower energy density inputs. Vega-Mercado et al. (2001) achieved up to 60% inactivation of a protease from *P. fluorescens* in skim milk, after applying a HIPEF treatment of 69.63 kJ/l using the WSU-C equipment. Bendicho et al. (2002a) achieved up to 62.1% inactivation with a HIPEF treatment of 504.97 kJ/l with the UdL-B equipment, whereas using the WSU-C device, a decrease in lipase of just 13% from *B. subtilis* activity was reached with an energy density input of 424.36 kJ/l.

It has been observed for the evaluated devices that single parameters such as pulse shape, pulse width, pulse repetition rate, or chamber configuration do not have a clear impact on the effectiveness of HIPEF treatments. Nevertheless, a combination of factors might lead to the differences in effect of the various HIPEF devices on the enzyme activity, at least at the levels of input energy densities evaluated. The activity of this microbial protease, as in all enzymes, depends on its specific internal three-dimensional structure. As has been observed in this paper, this enzyme has different responses to HIPEF, depending on the HIPEF device used to process the samples. Thus, the changes in the conformational structure of the molecule might depend on the HIPEF conditions and on the configuration of the treatment chamber, which seems to be the main difference among the HIPEF equipment checked in this experiment. Other enzymes showed higher or lower sensitivity to HIPEF treatments (Castro et al., 1994; Vega-Mercado et al., 1995; Giner et al., 2000; Vega-Mercado et al., 2001; Giner et al., 2001; Bendicho et al., 2002a). The differing behavior of an enzyme to HIPEF mainly depends on its conformational structure and its sensitivity to being exposed to electric field perturbations, which would lead to protein unfolding and denaturation, breakdown of covalent bonds, and oxidation-reduction reactions (Barsotti and Cheftel, 1999).

CONCLUSIONS

The protease from *B. subtilis* evaluated in this study did not show high resistance to current thermal treatments, since, in milk, a high reduction of protease activity was achieved by both high and low pasteurization treatments in milk, although it is more resistant to heat when suspended in SMUF. However, HIPEF treatments of 500 kJ/l slightly affected the activity of the studied protease, since no significant variation of the protease activity was observed after subjecting the samples to UdL-B or to UdL-C treatments, but a slight inactivation or a little activation was observed when samples were processed using the WSU-C equipment, depending on whether the enzyme was suspended in SMUF or in milk, respectively.

In this paper, it has been proven that the activity of bacterial enzymes in SMUF or milk can hardly be varied using HIPEF treatments. Further investigations are required to achieve more effective treatments. Processes of higher energy density inputs should be tested in order to obtain more clear results about the effects of HIPEF on this enzyme, what would enable the elucidation of the most important parameters involved on enzyme inactivation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of Spain for their support of the work included in Project ALI 97 0774, and thank the Ministerio de Educación, Cultura y Deportes for supporting the research grant involved, as well as Silvia Bendicho's stay at Washington State University (Pullman, WA, USA).

REFERENCES

- Adams, D.M., Barach, J.T., Speck, M.L. 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.* 58: 828-834.
- Bendicho, S., Estela, C., Giner, J., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. (2002a): «Effect of high intensity pulsed electric field and thermal treatments on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*» *Journal of Dairy Science*, 85: 19-27.
- Bendicho, S., Espachs, A., Arántegui, J., Martín, O. 2002b. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *J. Dairy Res.* (in press)
- Bendicho S., Rosell, J.R., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín O. 2002c. Inactivation kinetics of a lipase from *Pseudomonas fluorescens* exposed to High Intensity Pulsed Electric Fields. *Journal of Dairy Research* (submitted).
- Bendicho, S., Martí, G., Hernández, T., and O Martín. 2002d. Determination of Proteolytic Activity in Different Milk Systems. *Food Chemistry* (submitted).
- Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K. 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiology* 16: 531-540.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 19-30.
- Castro, A.J. 1994. Pulsed electric field modification of activity and denaturation of alkaline phosphatase. Ph.D. thesis, Washington State University, Pullman, Washington.
- Dunn, J.E., and J.S. Pearlman. 1987. Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. US Patents nº 4 695 472.
- Giner J., Gimeno, V., Espachs, A., Elez, P., Barbosa-Cánovas, G.V., and O. Martín. 2000. Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* 1: 57-67.
- Giner J., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G.V., and O. Martín. 2001. Effects of Pulsed Electric Fields Processing on Apple and Pear Polyphenoloxidases. *Food Sci. and Technol. Int.* (in press).
- Gilliand, S.E., and M.L. Speck. 1967. Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. *Appl. Microbiol.* 15 (5): 1031-1037.
- Grahl, T., and H. Märkl. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 148-157.
- Griffiths, M.W., Phillips, J.D., Muir, D.D. 1981. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Applied Bacteriology*, 50: 289-303.
- Ho, S.Y., Mittal, G.S., and J. D. Cross. 1997. Effects of high electric pulses on the activity of selected enzymes. *J. Food Eng.* 31: 69-84.

- Jeness, R., and J. Koops. 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.* 16 (3): 153-164.
- Martín, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *J. Food Proc. Eng.* 20: 317-336
- Michalac, S.L., Álvarez, V.B. and Q.H. Zhang. 1999. Microbial reduction in skim milk using PEAC technology. IFT Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Chicago, Illinois, USA.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1995a. High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 35: 101-107.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1995b. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Res. Int.* 28: 167-171.
- Richard, J. 1981. Classification adansonienne et identification de *Pseudomonas* psychrotrophes isolés du lait cru conservé à basse température. *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)* 132A: 171-182.
- Van Loey, A., Verachtert, B., Hendrickx, M. 2002. Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends in Food Science & Technology*, 12: 94-102.
- Vega-Mercado, H., Powers, J., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1995. Plasmin inactivation with pulsed electric fields. *J. Food Sci.* 60: 1143-1146.
- Vega-Mercado, H., Powers, J.R., Martín-Belloso, O., Barbosa-Cánovas, G.V., Luedeche, L., & Swanson, B. G. (2001). Change in susceptibility of proteins to proteolysis and the inactivation of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 when exposed to pulsed electric fields. In G.V. Barbosa-Cánovas and Q. H. Zhang, *Pulsed electric fields in food processing: Fundamental aspects and applications* (Chapter 7). Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc.
- Zhang, Q., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., and B.G. Swanson. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* and *Sacharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 37: 581-587.