



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

# **Utilización de la Ultra Alta Presión por Homogenización como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche de consumo**

Director: Antonio José Trujillo Mesa

Tesis Doctoral

**JULIETA PEREDA**

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2008



Membre de:



ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Profesor Titular de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona,

HACE CONSTAR: Que Julieta Pereda ha realizado, bajo su dirección, el trabajo titulado **“Utilización de la ultra alta presión por homogenización como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche de consumo”** que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste, firmo el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 9 de octubre de 2008.

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

---

Este trabajo se ha realizado con la financiación aportada por:

- La Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), mediante su programa de becas predoctorales FI-IQUC.
  - La Unión Europea a través del proyecto de investigación (CRAFT 512626).
-

## AGRADECIMIENTOS

A **Toni** (mi tutor) por ofrecerme la oportunidad de trabajar con él, porque siempre por más ocupado que estuviera tuvo tiempo para atenderme, por su paciencia, por haber tenido confianza en mi, por haberme dado la posibilidad de ir a tantos congresos y porque trabajando con él aprendí muchísimo.

A **Joan Miquel** por haberme ayudado siempre en la planta piloto sin importar lo complicado que el estuviera y por sus charlas, buen humor y honestidad.

A **Ramón** y a **Jordi** porque son dos personas con quienes siempre se puede contar para pedir un favor.

A **Manoli** por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A **Julia** (secretaria) por su eficiencia y simpatía que hace que las cosas sean más sencillas.

A mis mejores amigos:

**Pame:** porque siempre estuvo en todo momento para ayudarme y enseñarme cuando recién llegué y por su disponibilidad para conversar y escuchar.

**Martín:** por las largas charlas de piscina (mucho charla y poco nadar), risas, por ser mi consejero en momentos de bajones y por sus ricos asados con Fernet que hicieron que me sintiera como en casa.

**Bego:** por ser una persona que siempre pone alegría y ganas a todo lo que hace y por haberme involucrado con su familia. Y claro que gracias por todos los pasteles que me has hecho en estos años.

**Nelly:** por su compañerismo, por sus conversaciones amenas y por ser la organizadora oficial de salidas nocturnas y la cocinera mexicana del grupo.

Y a los cuatro les agradezco por todos los buenos momentos compartidos, charlas, risas, salidas, viajes y por acompañarme en los momentos difíciles pero sobre todo por ser tan buenos amigos.

A **Mar** y **Anna** por haberme ayudado con el trabajo de la planta y a **Sonia** por su ayuda en el laboratorio para tener siempre los materiales necesarios.

A todos los compañeros, tanto del departamento de Tecnología de los Alimentos como del Departamento de Higiene, **Bibi, Roger, Idoia, Natalia, Diana, Dora, Vanesa, Fabio, Rita, Angela, Abel, Dolors, Isha** y a aquellos que ya se han ido: **Betty, Tomás, Ibrahima, Raúl** por haberme integrado tan rápido al grupo cuando llegué y por los buenos momentos compartidos.

A todos los amigos de fuera de la UAB, especialmente a **Lucas y Eva, Tere, Simo y Martina** por todos los momentos compartidos.

A **mi familia y a la de Nico** por haber logrado que a pesar de estar tan separados en distancia siempre los sintiera a mi lado y por haberme apoyado y dado fuerzas en todo momento para emprender esta experiencia.

Quiero dedicar esta tesis a **Nico** y agradecerle por haberse unido a esta aventura de abandonar todo y venir a empezar de nuevo, por animarme en los momentos difíciles, por su paciencia, por escucharme, ayudarme y por estar siempre a mi lado.

---

# Indice

## Sección I

### *Antecedentes, Objetivos y Plan de Trabajo*

<b>1. Antecedentes, Objetivos y Plan de trabajo</b> .....	3
1.1 Antecedentes .....	3
1.2 Objetivos .....	5
1.2.1 Objetivo general .....	5
1.2.2 Objetivos específicos .....	5
1.3 Plan de trabajo .....	6

## Sección II

### *Introducción*

<b>2. Introducción</b> .....	13
2.1 La leche .....	13
2.1.1 Definición .....	13
2.1.2 Propiedades físicas.....	13
2.1.3 Composición química global de la leche.....	14
2.2 Tratamiento térmico .....	15
2.3 Ultra alta presión homogenización (UHPH).....	17
2.3.1 Equipos de alta presión homogenización.....	18
2.3.2 Incremento de la temperatura del fluido durante el tratamiento de UHPH .....	21
2.4 Cambios en los componentes de la leche inducidos por el tratamiento térmico y por el tratamiento UHPH	24
2.4.1 Reducción de la carga microbiana.....	24
2.4.1.1 Mecanismo de inactivación de la UHPH sobre los microorganismos .....	25
2.4.1.2 Factores que afectan la inactivación de microorganismos tratados por UHPH .....	26
2.4.1.3 Inactivación de la microbiota nativa de la leche .....	30
2.4.2 Activación / Inactivación de enzimas.....	32

2.4.2.1 Enzimas endógenas .....	32
2.4.2.2 Enzimas de la microbiota psicrótrofa .....	37
2.4.3 Materia grasa.....	37
2.4.3.1 El glóbulo graso.....	38
2.4.3.2 Estabilidad de la emulsión grasa.....	38
2.4.3.3 Cambios físicos y químicos en el glóbulo graso.....	39
2.4.4 Proteínas.....	43
2.4.4.1 Micelas de caseína.....	43
2.4.4.2 Proteínas del suero.....	46
2.4.5 Minerales.....	47
2.4.6 Lactosa.....	48
2.4.7 Cambios en el flavor.....	49
2.4.8 Vitaminas.....	50
2.5 Efectos de la ultra alta presión homogenización sobre las propiedades de la leche .....	51
2.5.1 Apariencia y pH.....	51
2.5.2 Propiedades de coagulación de la leche.....	52
2.5.2.1 Coagulación enzimática.....	52
2.5.2.2 Coagulación ácida.....	53
2.5.3 Características del queso elaborado a partir de leche UHPH .....	53
2.5.4 Características del yogur elaborado a partir de leche UHPH .....	56

### **Sección III**

#### ***Publicaciones relacionadas con la tesis***

<b>3. Publicaciones relacionadas con la tesis.....</b>	<b>65</b>
3.1 Effect of ultra high-pressure homogenization on natural-occurring micro-organisms in bovine milk .....	67
3.2 Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk.....	73
3.3 Characterization of volatile compounds in ultra-high pressure homogenized milk.....	89
3.4 Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage .....	101

3.5 Effects of ultra-high pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage .....	111
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## **Sección IV**

### ***Resultados y discusión***

<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>121</b>
4.1 Pruebas preliminares.....	121
4.2 Potencial de la tecnología UHPH como alternativa al tratamiento térmico ....	124
4.2.1 Reducción microbiana .....	124
4.2.2 Estabilidad física del glóbulo graso.....	125
4.2.3 Activación / Inactivación de enzimas.....	128
4.2.4 Apariencia física.....	129
4.2.5 Proteólisis.....	130
4.2.6 Lipólisis.....	134
4.2.7 Oxidación.....	135
4.2.8 Indicadores del tratamiento térmico.....	135
4.2.9 Perfil de compuestos volátiles.....	139
4.2.10 Análisis sensorial .....	140

## **Sección V**

### ***Conclusiones***

<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>145</b>
-----------------------------	------------

## **Sección VI**

### ***Bibliografía***

<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>151</b>
-----------------------------	------------

## **Sección VII**

### ***Anexos***

<b>7. Anexo I: Heat damage evaluation in ultra high pressure homogenized milk.</b>	<b>169</b>
------------------------------------------------------------------------------------	------------





---

## Índice de tablas no incluidas en las publicaciones

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas de la leche	14
<b>Tabla 2.</b> Composición química de la leche	14
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos térmicos más utilizados en la industria láctea	16
<b>Tabla 4.</b> Composición lipídica de la leche	38
<b>Tabla 5.</b> Principales efectos producidos por la UHPH en leche entera a diferentes presiones y temperaturas utilizando equipos de marca Stansted	58
<b>Tabla 6.</b> Recuentos microbiológicos (log cfu/mL) de leche cruda y leches tratadas por UHPH	122
<b>Tabla 7.</b> Preparación de las soluciones utilizadas para producir leches con diferentes defectos	141

---

## Índice de figuras no incluidas en las publicaciones

<b>Figura 1.</b>	Plan de trabajo seguido para la selección de las condiciones del tratamiento UHPH más propicias	7
<b>Figura 2.</b>	Análisis efectuados en las leches para evaluar su evolución durante la vida útil	9
<b>Figura 3.</b>	Diseño de la válvula de un homogenizador convencional APV-Gaulin	19
<b>Figura 4.</b>	Diseño de la válvula de un homogenizador Stansted	21
<b>Figura 5.</b>	Esquema de un equipo tipo de ultra alta presión homogenización	22
<b>Figura 6.</b>	Distribución de tamaño de partícula tipo de muestras de leche cruda, UHPH (200 y 300 MPa, $T_i = 30^\circ\text{C}$ ) y de pasteurización alta (PA)	126
<b>Figura 7.</b>	Área de los picos residuales de las diferentes caseínas $\alpha_{s1}$ - (a), $\alpha_{s2}$ - (b), $\kappa$ - (c) y $\beta$ -caseína (d) para el día 1 y 21 de almacenamiento	131
<b>Figura 8.</b>	Concentración de hidroximetilfurfural (HMF) libre y total, furosina, lactulosa y niveles residuales de proteínas del suero en leches UHPH y de alta pasteurización (PA) y en leches comerciales esterilizada (EST), UHT y de alta pasteurización (PAC)	138

---

## Listado de abreviaciones

ALP	Fosfatasa alcalina
A340	Compuestos que absorben a 340 nm
CE	Electroforesis capilar
CN	Caseína
DMS	Dimetilsulfide
DVB/Carboxen/PDMS	Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
D50	Diámetro debajo del cual se encuentra el 50% de las partículas
D90	Diámetro debajo del cual se encuentra el 90% de las partículas
d <sub>3,2</sub>	Diámetro medio de la superficie total correspondiente a las partículas
d <sub>4,3</sub>	Parámetro relacionado con la presencia de pequeñas cantidades de agregados de partículas
EST	Leche esterilizada en botella
FAA	Aminoácidos libres totales
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FFA	Acidos grasos libres
FID	Detector de ionización de llama
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases – espectrofotometría de masas
HHP	Alta presión hidrostática
HMF	Hidroximetilfurfural
HTST	Pasteurización de alta temperatura y corto tiempo (72°C, 15 s)
Ig	Inmunoglobulina
La	Lactoalbúmina
LCFFA	Acidos grasos libres de cadena larga (C <sub>14:0</sub> – C <sub>18:2</sub> )
Lg	Lactoglobulina
LP	Lactoperoxidasa
LPL	Lipoproteinlipasa
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MCFFA	Acidos grasos libres de cadena media (C <sub>10:0</sub> – C <sub>14:0</sub> )

MDA	Malondialdehído
MFGM	Membrana del glóbulo graso
MSD	Detector selectivo de masas
PA	Leche de pasteurización alta (90°C, 15 s)
PAC	Leche comercial de pasteurización alta
PCA	Agar de recuento en placa
pH 4,6 - SN	Nitrógeno soluble a pH 4,6
PG	Plasminógeno
PL	Plasmina
SCFFA	Acidos grasos libres de cadena corta (C <sub>4:0</sub> – C <sub>8:0</sub> )
SH	Grupos sulfidrilos
SPME	Microextracción en fase sólida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias que reaccionan con el TBA
To	Temperatura de salida de la muestra del equipo de alta presión homogenización
Ti	Temperatura de entrada de la muestra en el equipo de alta presión homogenización
TS	Sólidos totales
T1	Temperatura de la muestra antes de pasar por la válvula de alta presión homogenización
T2	Temperatura de la muestra luego de pasar por la válvula de alta presión homogenización
UHPH	Ultra alta presión homogenización
UHT	Ultra alta temperatura
VRBL	Agar Bilis - Rojo - Neutro - Violeta Cristal con lactosa

---

## Artículos publicados relacionados con la tesis

- **Título:** Effect of Ultra High-Pressure Homogenisation on Natural-Occurring Micro-Organisms in Bovine Milk.  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A J.  
**Referencia:** Milchwissenschaft 61, 245-248, 2006.
- **Título:** Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf life of Milk  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., Trujillo, A J.  
**Referencia:** Journal of Dairy Science 90, 1081-1093, 2007.
- **Título:** Characterization of flavour volatile compounds in ultra-high pressure homogenized milk.  
**Autores:** Pereda, J., Jaramillo, D. P., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A J.  
**Referencia:** International Dairy Journal, 18, 826-834, 2008.
- **Título:** Proteolysis of ultra-high pressure homogenized treated milk during refrigerated storage  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., Trujillo, A J.  
**Referencia:** Food Chemistry, 111, 696-702, 2008.
- **Título:** Effects of ultra-high pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., Trujillo, A J.  
**Referencia:** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 7125-7130, 2008.

---

## Presentaciones en congresos

- **Título:** Effects of Ultra High Pressure Homogenization on microbial shelf-life as an alternative to heat pasteurization.  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Jaramillo, P., Guamis, B., Trujillo, A.J.  
**Congreso:** AFE-Tech-1st Workshop: Applied Food Emerging Technologies.  
**Lugar y fecha:** Barcelona, España, 5-7 julio 2006.  
**Tipo de participación:** Comunicación oral y póster
- **Título:** Effects of Ultra High Pressure Homogenization on natural occurring microorganisms in bovine milk.  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J.  
**Congreso:** IUFOST. 13<sup>th</sup> World Congress of food Science and Technology  
**Lugar y fecha:** Nantes, Francia, 17-21 septiembre 2006.  
**Tipo de participación:** Comunicación oral y póster
- **Título:** Efectos de la homogenización a ultra alta presión sobre la vida útil microbiana y físico-química de la leche de vaca  
**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J.  
**Congreso:** XXII G-TEMCAL. Jornada sobre calidad de la leche.  
**Lugar y fecha:** Barcelona, España, 19-20 octubre 2006.  
**Tipo de participación:** Comunicación oral
- **Título:** Effect of Ultra-High Pressure Homogenisation on the Microbiology and Rennet coagulation properties of goats milk  
**Autores:** Trujillo, A. J., Zamora, A., Pereda, J., Quevedo, J. M., Guamis, B.  
**Congreso:** 5<sup>TH</sup> International Symposium on the challenge to sheep and goats milk sectors.  
**Lugar y fecha:** Alguero, Italia, 18-20 abril 2007  
**Tipo de participación:** Póster

- Título:** Efectos de la homogenización a ultra alta presión sobre la vida útil microbiana y físico-química de la leche de vaca.

**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J.

**Congreso:** IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los alimentos.

**Lugar y fecha:** Tenerife, España, 13-15 junio 2007

**Tipo de participación:** Comunicación electrónica
- Título:** Characterization of flavour volatile compounds in ultra high pressure homogenized milk

**Autores:** Pereda, J., Jaramillo, D. P., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J.

**Congreso:** 5<sup>TH</sup> NIZO Dairy Conference: Prospects for flavour formation and perception.

**Lugar y fecha:** Papendal, Holanda, 13-15 junio 2007

**Tipo de participación:** Comunicación oral
- Título:** Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physico-chemical Shelf-life of Milk.

**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., Trujillo, A. J.

**Congreso:** European Congress of Chemical Engineering ( ECCE-6).

**Lugar y fecha:** Copenhagen, Dinamarca, 16-20 septiembre 2007

**Tipo de participación:** Comunicación oral
- Título:** Proteolysis and lipolysis of ultra-high pressure homogenized treated milk during refrigerated storage

**Autores:** Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., Trujillo, A. J.

**Congreso:** IDF Dairy Science and Technology Week 2008

**Lugar y fecha:** Quebec, Canadá, 12-16 mayo 2008

**Tipo de participación:** Comunicación oral





# **SECCIÓN I**

---

**Antecedentes, Objetivos y Plan de Trabajo**



---

# 1. Antecedentes, Objetivos y Plan de trabajo

## 1.1 Antecedentes

El sector lácteo representa una forma de vida en muchos territorios de la geografía española, donde constituye la única opción laboral para muchas personas que viven de esta actividad. Según datos publicados por el antiguo Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2007) la industria láctea española representa casi el 11% del total de la facturación de la industria alimentaria, además de generar un 7,14% de los puestos de trabajo.

La Unión Europea es el principal productor de leche de vaca a nivel mundial con una producción de 149.013.000 toneladas (FAO, 2006). La producción española supone aproximadamente el 4,5% del total comunitario por detrás de Alemania con un 19% de la producción, Francia con un 16%, Reino Unido con un 9% y Países Bajos e Italia con un 9% del total (FAO, 2006).

El consumo medio por habitante en la Unión Europea es de 88,4 litros. El Estado español se encuentra por encima del consumo medio ocupando el quinto puesto por orden de importancia con un consumo por persona y año que asciende a 100 litros (COAG, 2006), lo que implica que de media un consumidor bebe más de un cuarto de litro de leche líquida al día durante todo el año. De este consumo medio, el 46% corresponde al consumo de leche entera, frente al 32% y 22% de la leche semidesnatada y desnatada, respectivamente (MAPA, 2006).

El consumidor es un elemento clave para el diseño de cualquier sector agroalimentario ya que sus gustos y preferencias van a condicionar la estrategia a seguir por la industria alimentaria. Por lo tanto, al igual que todo el sector alimentario, la cadena de producción de lácteos debe adaptarse a los cambios preferenciales que ha experimentado el consumidor. De un tiempo a esta parte, nos encontramos con un consumidor mucho más sensibilizado por aspectos tales como la seguridad y calidad alimentaria, el respeto por el medio ambiente y por supuesto por los aspectos nutricionales y organolépticos de los alimentos que consume. Debido a todo ello, en los últimos años, las diversas industrias han comenzado a trabajar para cubrir las demandas del consumidor, abordando la modernización de instalaciones, la búsqueda de nuevas tecnologías y la creación de sistemas de seguridad y de calidad. Estas nuevas tendencias

de mercado han conducido a que tecnologías tradicionales como el tratamiento térmico estén siendo sustituidas en diferentes alimentos por tecnologías alternativas que eviten las pérdidas nutricionales y los cambios en las características organolépticas de estos alimentos cuando son sometidos a altas temperaturas. Dentro de estos nuevos tratamientos no térmicos nos encontramos con: campos de pulsos eléctricos y campos magnéticos oscilantes (Deeth y Datta, 2004), irradiación, ultrasonidos, microfiltración (Datta y Deeth, 2004b) y la alta presión hidrostática (HHP) (Datta y Deeth, 2004a).

Desde el año 1993, el Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) ha participado en numerosos proyectos nacionales y en cuatro proyectos europeos sobre la aplicación de las altas presiones en alimentos.

En el primer proyecto europeo (AIR1-CT92-0296 “High hydrostatic pressure treatment; its impact on spoilage organisms, biopolymer activity, functionality and nutrient composition of food systems”) nuestro grupo estudió el efecto de las HHP sobre microorganismos patógenos, indicadores y bacterias lácticas inoculadas en leche de oveja. En el segundo proyecto (FAIR-CT96-1113 “High pressure treatment of liquid foods and derived”) se estudiaron distintos aspectos de la aplicación de las HHP en las proteínas de leche de cabra, su aplicación para producir queso a partir de leche presurizada de cabra o yogurt a partir de leche presurizada de oveja y su utilización para acelerar la maduración del queso de cabra.

Sin embargo, el hecho de que la tecnología HHP sólo permita actualmente tratar volúmenes pequeños de alimentos, sumado a que es un proceso discontinuo, ha llevado a que en los últimos años se comenzara a investigar en una nueva tecnología de alta presión específica para el procesamiento de líquidos de manera continua llamada ultra alta presión homogenización (UHPH). El CERPTA fue el coordinador del tercer proyecto europeo (CRAFT 512626 “Development and optimization of a continuous ultra high pressure homogeniser for application on milks and vegetable milks”) cuyos objetivos principales fueron estudiar los cambios producidos en la leche y en diferentes licuados vegetales al aplicar la tecnología de la ultra alta presión homogenización y su potencial capacidad para producir a partir de leche o licuados tratados, diferentes productos derivados (queso y yogur).

Actualmente nos han concedido un cuarto proyecto europeo (PF7-SME2008-1 “Study of functionality, nutritional and safety aspects of liquid foods, liquid food preparations and cosmetics processed by ultra-high pressure homogenisation”) cuyos

principales objetivos son estudiar la funcionalidad tecnológica y biológica de alimentos y cosméticos procesados mediante la tecnología UHPH para diseñar alimentos funcionales de elevada seguridad y valores nutricionales. Se espera obtener nuevos productos con mejores características funcionales (mejor estabilidad durante el almacenamiento, mayor vida útil, inmunoreactividad reducida, sistemas de transporte micro y nano de compuestos bioactivos y características organolépticas excelentes) que construyan nuevos nichos de mercados nacionales y trans-regionales para las PYMEs que participan en este proyecto.

En base a estudios previos de otros autores en los que se ha visto que la UHPH es una nueva tecnología que posibilita la inactivación microbiana (Hayes y Kelly, 2003b; Vachon, Kheadr, Giasson, Paquin y Fliss, 2002), la modificación de las principales estructuras de la leche como el glóbulo graso (Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud y Cheftel, 2003), las micelas de caseína (Hayes y Kelly, 2003b) e incluso produce cambios en la actividad enzimática (Hayes y Kelly, 2003a) hemos planteado los objetivos para el presente trabajo.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

La presente tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto europeo CRAFT 512626 (2004-07) titulado “Development and optimization of a continuous ultra high pressure homogeniser for application on milks and vegetable milks” y ha tenido como objetivo general:

*Evaluar la capacidad potencial de la tecnología de ultra alta presión homogenización como alternativa al tratamiento térmico convencional para la obtención de leche líquida de consumo con garantías sanitarias y características organolépticas adecuadas.*

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones de presión y temperatura necesarias para alcanzar una reducción microbiana inicial acorde a la normativa vigente para leches tratadas térmicamente.

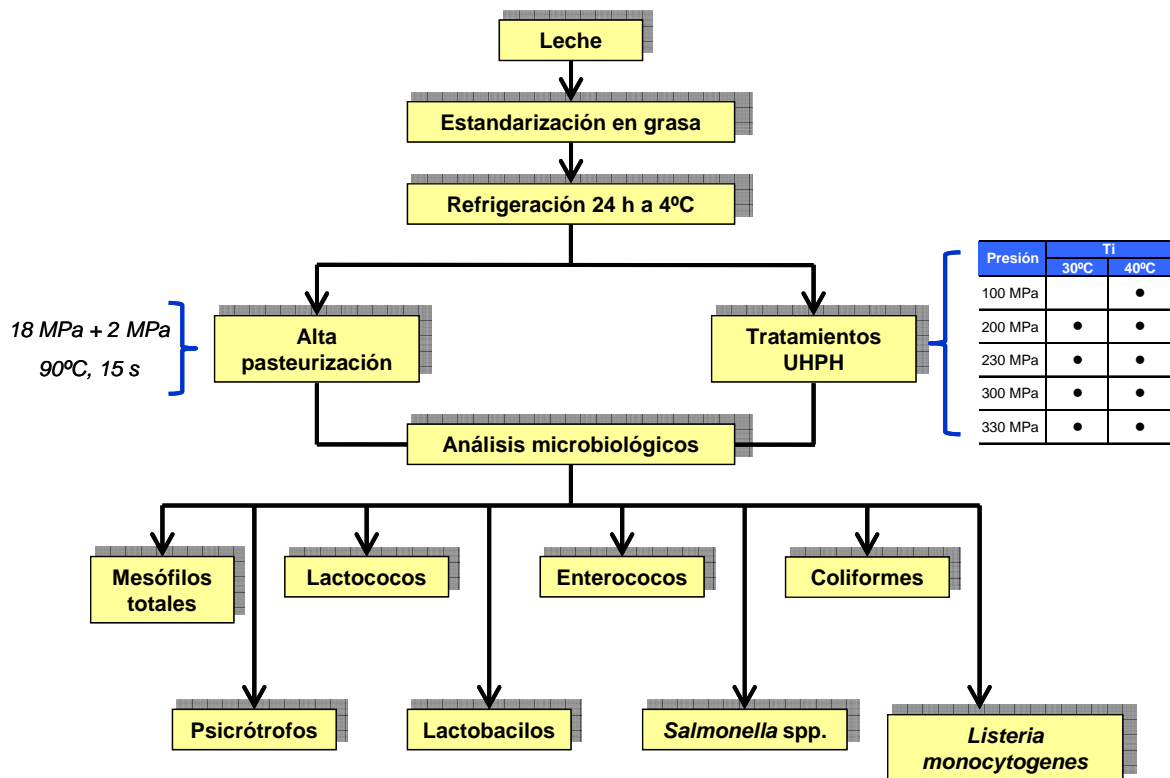
- Caracterizar microbiológicamente las leches tratadas por UHPH durante su vida útil.
- Estudiar cambios en propiedades físico-químicas como la reducción del tamaño del glóbulo graso, viscosidad, color, pH y tasa de desnatado.
- Caracterizar el perfil de compuestos volátiles de estas leches mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPME) y posterior determinación por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (CG-MS).
- Evaluar el efecto de la UHPH sobre la actividad de enzimas como la fosfatasa alcalina, lactoperoxidasa y plasmina.
- Estudiar los efectos de la UHPH sobre la proteólisis desarrollada en las leches (caseínas, péptidos, aminoácidos).
- Estudiar la lipólisis, mediante la determinación de la concentración de ácidos grasos libres por cromatografía de gases.
- Estudiar la oxidación primaria (hidroperóxidos) y la secundaria (hexanal y TBARS) sufrida por las leches tratadas por UHPH.
- Determinar los indicadores del tratamiento térmico mediante dos tipos de reacciones: la desnaturalización de las proteínas del suero y la formación de nuevas sustancias como la lactulosa o productos de la reacción de Maillard.
- Estudiar las características sensoriales de las diferentes leches.

### **1.3 Plan de trabajo**

Para cumplir con el primer objetivo se efectuaron 8 repeticiones preliminares de tratamientos UHPH donde se evaluaron leches de diferente calidad microbiológica ( $3 \times 10^4$  -  $8 \times 10^6$  ufc/mL). Los tratamientos aplicados fueron 100, 200, 300 MPa (simple etapa) y 230, 330 (doble etapa, 30 MPa en la segunda válvula) con temperaturas de entrada de la leche ( $T_i$ ) de 30 y 40°C. El tratamiento de 100 MPa únicamente se efectuó con temperatura de entrada de 40°C. Durante los tratamientos de UHPH se midió la temperatura antes ( $T_1$ ) y después ( $T_2$ ) de la válvula de alta presión, así como la temperatura de salida ( $T_f$ ). En base al registro de temperaturas obtenidas durante los

tratamientos UHPH se consideró apropiado utilizar como control una leche de pasteurización alta (90°C, 15 s). Todas las muestras fueron analizadas microbiológicamente tras la aplicación de los respectivos tratamientos tecnológicos. En todos los casos, excepto en la leche tratada a 100 MPa, se alcanzó una reducción microbiana significativa ( $P < 0,05$ ) en comparación a la leche cruda de partida, situándose esta reducción dentro de los límites establecidos por la normativa Europea para leches tratadas térmicamente. Por otra parte, no se detectaron diferencias entre las leches tratadas a simple y doble etapa, por lo que para acotar las muestras del estudio se decidió que los tratamientos más interesantes para estudiar eran los de 200 y 300 MPa con temperatura de entrada de 30 y 40°C a simple etapa. A pesar de que tampoco se detectaron diferencias en los recuentos microbianos entre muestras tratadas a la misma presión pero con diferente temperatura de entrada, se consideró importante trabajar con ambas temperaturas ya que de esta manera se podía cubrir un intervalo más amplio de temperaturas máximas alcanzadas en la leche (75 - 100°C).

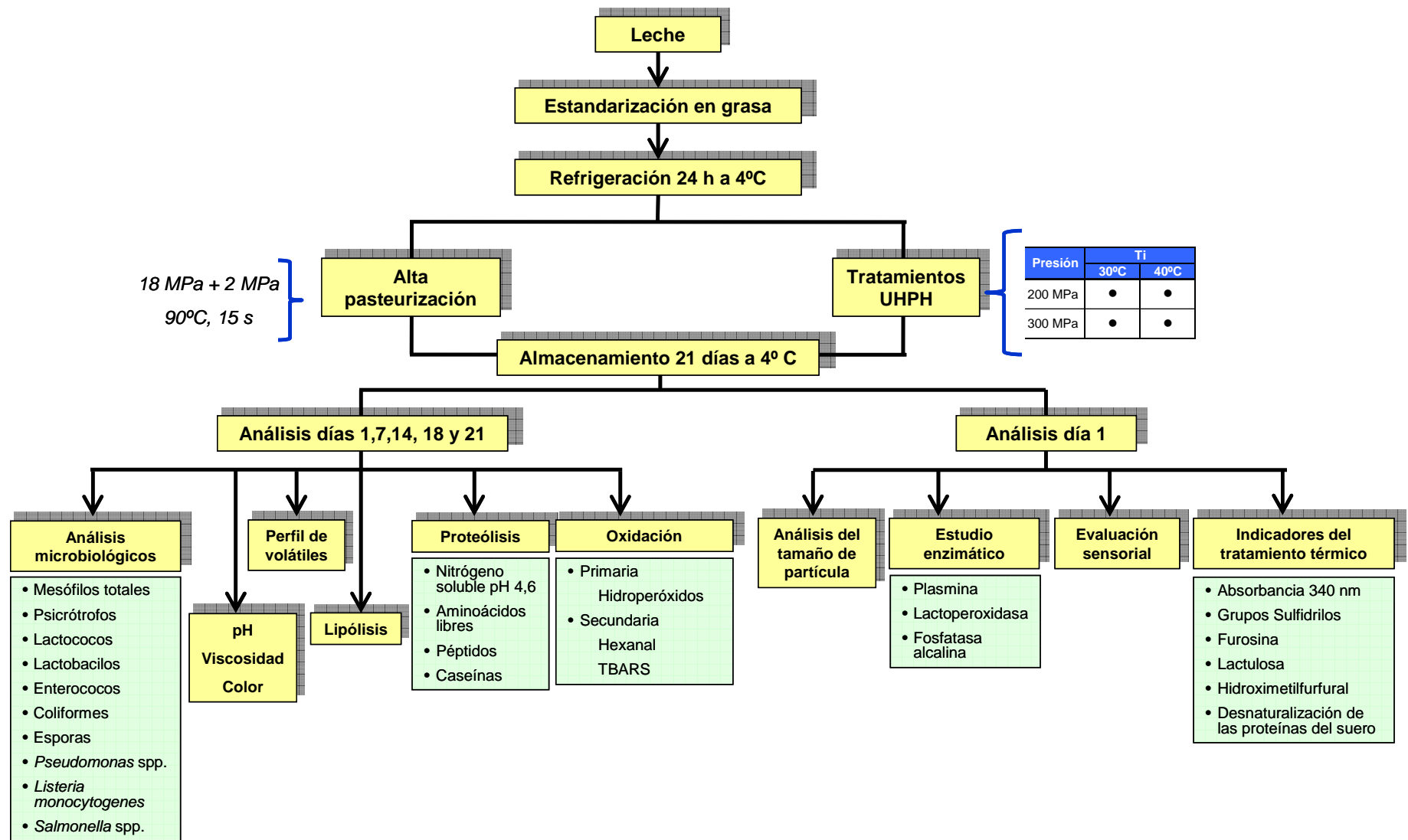
La Figura 1 muestra el plan de trabajo que se siguió para cumplir con el primer objetivo específico planteado.



**Figura 1:** Plan de trabajo seguido para la selección de las condiciones del tratamiento UHPH más propicias.



Para llevar a cabo el resto de los objetivos se realizaron tres repeticiones en las que se aplicó a la leche las condiciones de presión y temperatura previamente escogidas (200 y 300 MPa;  $T_i = 30$  y  $40^\circ\text{C}$ ) y con la misma leche de partida se elaboró la leche de pasteurización alta ( $90^\circ\text{C}$  y 15 s). Una vez tratadas, las muestras fueron almacenadas a  $4^\circ\text{C}$  durante 21 días. La Figura 2 detalla los estudios realizados sobre las muestras así como los días en que éstos fueron efectuados.



**Figura 2:** Análisis efectuados en las leches para evaluar su evolución durante la vida útil.



# SECCIÓN II

---

Introducción



---

## **2. Introducción**

### **2.1 La Leche**

#### **2.1.1 Definición**

Se entiende por leche natural la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida a partir de uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior. Deben añadirse, una o más palabras que indiquen el animal o, en el caso de una mezcla, todos los animales de los cuales procede la leche, salvo que su omisión no induzca a error al consumidor (Comisión del Codex Alimentarius, 1996).

Desde un punto de vista físicoquímico la leche es un fluido acuoso complejo formado por la presencia de varias fases en equilibrio. Posee una fase continua consistente en una solución acuosa verdadera de lactosa, sales orgánicas e inorgánicas, proteínas, vitaminas y otras pequeñas moléculas y dos fases discontinuas; una de ellas son los lípidos, existentes como glóbulos grasos con diámetros de 0,1 a 20  $\mu\text{m}$ , que forman una emulsión con la fase continua, y la otra fase consiste en agregados coloidales (caseínas) cuyo diámetro puede oscilar entre 50 y 600 nm. Por lo tanto, podría decirse que la leche es una emulsión de una fase grasa dispersa y una fase acuosa coloidal continua.

#### **2.1.2 Propiedades físicas**

Las propiedades físicas de la leche son similares a las del agua pero difieren ligeramente debido a la presencia de solutos como la lactosa, proteínas y sales en la fase continua y por el grado de dispersión de los componentes emulsificados y coloidales. En la Tabla 1 se muestran las principales propiedades físicas de la leche.

**Tabla 1:** Propiedades físicas de la leche (Fox y McSweeney, 1998d; Walstra y Jenness, 1984b; Walstra, Wouters y Geurts, 2006e)

Propiedad física	Valor
Densidad (20°C)	~ 1030 kg/m <sup>3</sup>
Presión osmótica	~ 700 kPa
pH	~ 6,7
Fuerza iónica	~ 0,08 M
Actividad de agua (a <sub>w</sub> )	~ 0,993
Coefficiente de viscosidad	~ 2,127 mPa s
Potencial Redox ( en equilibrio con aire )	~ +0,2 - +0,3 V
Acidez	~ 14 - 21 mmol NaOH
Indice de refracción	~ 1,338
Calor específico	~ 3900 J kg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>

### 2.1.3 Composición química global de la leche

En la Tabla 2 se muestra la composición química global de la leche. Se debe tener en cuenta que la composición puede variar dependiendo de la salud del animal, del estado nutricional, etapa de lactación, edad, intervalo entre ordeños, etc (Fox y McSweeney, 1998e).

**Tabla 2:** Composición química de la leche (Goursaud, 1991)

Componente	Contenido medio (% p/p)
Agua	90,2
Glúcidos	4,9
<i>Lactosa</i>	4,9
Grasa	3,9
<i>Lípidos</i>	3,8
<i>Fosfolípidos</i>	0,5
<i>Compuestos liposolubles</i>	0,5
Materia nitrogenada	3,3
<i>Proteínas</i>	3,27
<i>Caseínas</i>	2,80
<i>Proteínas solubles</i>	0,47
<i>Materia no proteica</i>	0,03
Sales	0,9
Vitaminas y enzimas	Trazas

## 2.2 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico se aplica a la leche con los objetivos de: en primer lugar garantizar la salud del consumidor eliminando los microorganismos patógenos que pudiesen estar presentes y en segundo lugar aumentar la vida útil eliminando los microorganismos y las enzimas que podrían generar cambios indeseables en el producto. Los tratamientos térmicos que pueden aplicarse se clasifican en función de la combinación de temperatura y tiempo aplicados (Tabla 3) dando lugar a diferentes tipos de leches.

A la mayoría de los consumidores les desagrada el sabor cocido de la leche y por lo tanto prefieren un tratamiento de baja intensidad, mientras que otros utilizan la leche principalmente en el café o te donde una vida útil más larga pasa a ser más importante que la ausencia de sabor a cocido.

El tratamiento térmico no sólo causa efectos beneficiosos sobre la leche como la inactivación microbiana sino que también genera ciertos cambios químicos y físico-químicos indeseables los cuales pueden afectar las propiedades nutricionales, organolépticas y/o tecnológicas de la leche dependiendo del tratamiento aplicado (Walstra, Wouters y Geurts, 2006a).

En las siguientes secciones iremos describiendo esos cambios en comparación a los descritos para la tecnología de UHPH.



**Tabla 3:** Tratamientos térmicos más utilizados en la industria láctea (Hinrichs y Kessler, 1995; Meunier-Goddik y Sandra, 2004; Rankin, 2004; Walstra *et al.*, 2006a)

Tratamiento	Temperatura	Tiempo	Objetivo	Vida útil
Termización	60 - 65°C	10 - 20 s	Extender el tiempo de almacenamiento de la leche en refrigeración eliminando bacterias, especialmente psicrótrofos	Hasta 3 días a 7°C
Pasteurización Baja				
<i>LTLT</i> ( <i>low temperature long time</i> )	62 - 65°C	30 min	Originariamente se buscaba asegurar la destrucción de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>bovis</i> (una de las bacterias patógenas no esporuladas más termorresistentes) sin afectar de manera importante a las propiedades físico-químicas de la leche y a sus características nutritivas y sensoriales. Actualmente los tiempos y temperaturas buscan destruir <i>Coxiella burnetii</i> (hasta el momento, patógeno más resistente al calor). Se produce la inactivación de la fosfatasa alcalina	5 - 10 días en refrigeración
<i>HTST</i> ( <i>high temperature short time</i> )	72 - 75°C	15 - 30 s		
Pasteurización Alta	85 - 100°C	20 s	Además de la inactivación de la fosfatasa alcalina se inactiva la lactoperoxidasa Se destruyen la mayoría de los microorganismos vegetativos pero no las esporas	14 - 18 días en refrigeración
Ultrapasteurización	138°C	2 s	Busca reducir significativamente la carga microbiana evitando la alteración sensorial provocada por un tratamiento térmico más intenso	Aproximadamente 90 días en refrigeración (< 7°C)
Esterilización				
<i>UHT</i> ( <i>ultra high temperature</i> )	135 - 150°C	20 - 2 s	Busca asegurar la destrucción de todos los microorganismos presentes que podrían alterar el producto durante el almacenamiento incluyendo las esporas. La plasmina sobrevive el tratamiento UHT y ciertas lipasas y proteasas de psicrótrofos sobreviven ambos tratamientos térmicos de esterilización	El producto es estable por más de 6 meses a temperatura ambiente
<i>en envase</i>	105 - 120°C	10 - 40 min		

### 2.3 Ultra alta presión homogenización (UHPH)

En los últimos años, debido a la creciente demanda por parte de los consumidores de productos naturales, nutritivos, seguros y a la vez sabrosos, la industria y los centros de investigación y desarrollo en alimentos se han dedicado a buscar y estudiar nuevas tecnologías de procesado y conservación de los alimentos. Estas nuevas tendencias de mercado han hecho que tecnologías tradicionales como el tratamiento térmico comiencen a ser sustituidas en algunos productos por tecnologías alternativas que eviten las pérdidas nutricionales y los cambios en las características organolépticas de los alimentos cuando son sometidos a temperatura. Dentro de estos nuevos tratamientos no térmicos encontramos: campos de pulsos eléctricos y campos magnéticos oscilantes (Deeth y Datta, 2004), irradiación, ultrasonidos, microfiltración (Datta y Deeth, 2004b) y la alta presión hidrostática (HHP) (Datta y Deeth, 2004a). Más recientemente se ha desarrollado una nueva tecnología, que es la ultra alta presión homogenización (UHPH).

Los homogenizadores convencionales que trabajan a presiones moderadas (20-50 MPa) son comúnmente utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos para dispersar fases no miscibles, estabilizar emulsiones o preparar productos con propiedades reológicas adecuadas (Thiebaud *et al.*, 2003). La homogenización es de especial interés en la industria láctea donde es usada desde hace años para reducir el tamaño del glóbulo graso con el fin de incrementar la estabilidad de la emulsión y evitar el desnatado y la coalescencia durante el almacenamiento. La tecnología UHPH se basa en los mismos principios que la homogenización convencional con la gran diferencia de que se pueden alcanzar presiones superiores a 200 MPa gracias al diseño de las válvulas y a la utilización de nuevos materiales. Además, esta tecnología tiene la ventaja, en comparación a la tecnología de alta presión HHP, que permite tratar grandes volúmenes de alimentos, sumado a que es un proceso continuo. Hasta el momento, se han utilizado diferentes equipos de homogenización por alta presión en industrias químicas, farmacéuticas y especialmente de alimentos y biotecnología con el fin de emulsificar, dispersar, mezclar y procesar sus productos (Floury, Desrumaux y Lardières, 2000; Gracia-Juliá *et al.*, 2008; Hayes, Fox y Kelly, 2005; Paquin, 1999; Popper y Knorr, 1990).

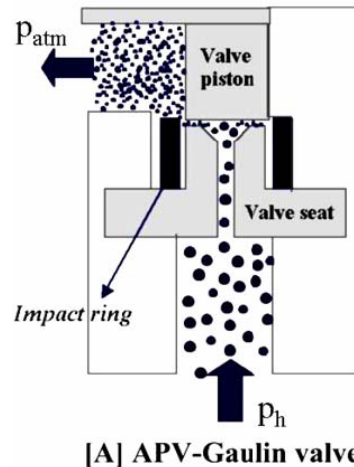
### 2.3.1 Equipos de alta presión homogenización

En la actualidad existen diversos equipos de alta presión homogenización entre los que se encuentran: PANDA (Gea Niro Soavi, Parma, Italia), APV-RANNIE (Dinamarca), APV-GAULIN (USA) los cuales pueden alcanzar presiones de hasta 150 MPa y por otro lado, MICROFLUIDIZER (Microfluidics International Corporation, Newton, MA, USA), NANOJET (Haskel, USA), EMULSIFLEX (Avestin, Canadá), y STANSTED (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK) los cuales pueden alcanzar presiones mayores debido a la existencia de nuevos materiales y nuevos diseños. A estos equipos capaces de alcanzar presiones superiores a los 200 MPa los designaremos como equipos de UHPH.

Básicamente, un homogenizador de alta presión consiste de un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones elevadas. En cualquier tipo de válvula de homogenización, el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula y luego se expande.

#### *Homogenizador APV-Gaulin, Rannie*

Los homogenizadores convencionales a alta presión (APV-Gaulin, Rannie) han sido estudiados por Paquin (1999) quien ha realizado una revisión de los efectos de la homogenización convencional a presiones de hasta 100 MPa sobre las propiedades funcionales de lípidos, proteínas y polisacáridos. Otros autores (Kleining y Middelberg, 1998; Middelberg, 1995; Pandolfe, 1999) han centrado sus estudios en los procesos físicos responsables de la ruptura de los glóbulos grasos y de los microorganismos. En la válvula clásica APV-Gaulin (Figura 3) el fluido es introducido axialmente a través del asiento de la válvula y luego se acelera radialmente en la pequeña región comprendida entre la válvula y el asiento. Una vez que el fluido deja este espacio (10-30  $\mu\text{m}$ ) impacta contra el cabezal de la válvula saliendo del homogenizador a presión atmosférica (Floury, Legrand y Desrumaux, 2004).



**Figura 3:** Diseño de la válvula de un homogenizador convencional APV-Gaulin.

#### *Panda (Gea Niro Soavi)*

Niro dispone de una variedad de equipos de alta presión para laboratorio y planta piloto capaces de trabajar entre 100 y 150 MPa con un flujo máximo de 120 L/h. Los equipos están equipados con diferentes tipos de válvulas según las características del material a ser procesado.

#### *Microfluidizer (Microfluidics International Corporation)*

Los microfluidizadores operan mediante un mecanismo diferente y a mayores presiones que los homogenizadores convencionales. Estos equipos contienen una bomba intensificadora que provee alta presión para forzar el producto a pasar a través de una cámara de interacción formada por dos microcanales, que harán que el producto se divida en dos corrientes al entrar a la cámara. Dichas corrientes se acelerarán y terminarán colisionando entre sí desde direcciones opuestas (Olson, White y Richter, 2004). El líquido se acelera dentro de la cámara debido a la disminución en el diámetro del tubo, a la liberación de presión y a los cambios abruptos en la dirección que conducen a golpes contra las paredes, causando estos fenómenos la ruptura de partículas en otras más pequeñas. La máxima velocidad de flujo que se puede alcanzar en la cámara es de 400 m/s y normalmente a la salida de la cámara de interacción se coloca un intercambiador de calor para enfriar rápidamente el producto tratado (Perrier Cornet, Marie y Gervais, 2005).

*Nanojet (Haskel)*

En estos equipos también se provee alta presión homogenización por medio de dos corrientes opuestas. Este proceso de alta presión fue desarrollado principalmente para la producción de microemulsiones, nanosuspensiones y liposomas estables (Burgaud, Dickinson y Nelson, 1990). Entre sus aplicaciones se incluye la biotecnología, industria de alimentos y entre ellas la láctea, industria farmacéutica, textil, de cosméticos y pintura. Los equipos que actualmente se comercializan son equipos de laboratorio cuya presión y flujo máximos son 200 MPa y 30 L/h.

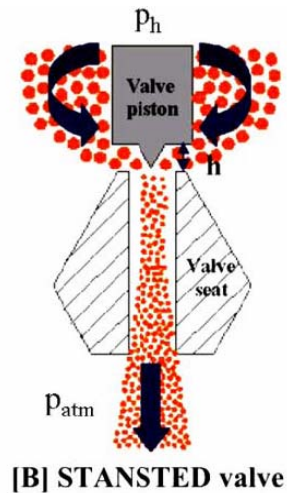
*Emulsiflex (Avestin)*

Estos homogenizadores pueden alcanzar presiones de hasta 200 MPa trabajando con flujos de 1,5-160 L/h, mientras que los equipos industriales alcanzan como máximo presiones de 100 MPa. La presión se alcanza gracias a una válvula especialmente diseñada para soportar altas presiones (Paquin, 1999).

*Stansted (Stansted Fluid Power Ltd.)*

Este es el equipo que concierne al trabajo realizado en esta tesis. La válvula de homogenización de la tecnología Stansted está fabricada con un material cerámico capaz de soportar presiones de hasta 400 MPa. Además, la geometría de la válvula es diferente comparada con la clásica válvula APV-Gaulin. La primera diferencia importante entre ambas válvulas radica en que en la válvula Stansted la dirección del fluido es contraria a la que se tendría en una válvula clásica de homogenización. En la válvula Stansted el fluido es alimentado axialmente a lo largo de la parte móvil de la válvula y luego se acelera radialmente por el espacio entre el cabezal y el asiento de la válvula (Floury *et al.*, 2004) (Figura 4). El tamaño de abertura entre el asiento y el cabezal (h), la velocidad resultante de la corriente y la presión del líquido antes de alcanzar la válvula, dependen de la fuerza con que se aplique el cabezal contra el asiento de la válvula, el cual puede ser ajustado para regular la intensidad o la presión de la homogenización. La caída de presión del líquido en la válvula es llamada “presión de homogenización” (Floury, Bellettre, Legrand y Desrumaux, 2004).

La segunda diferencia consiste en que utilizando la válvula Stansted se pueden alcanzar presiones de hasta 400 MPa mientras que en una válvula APV-Gaulin sólo se alcanzan presiones de 70-100 MPa.



**Figura 4:** Diseño de la válvula de un homogenizador Stansted

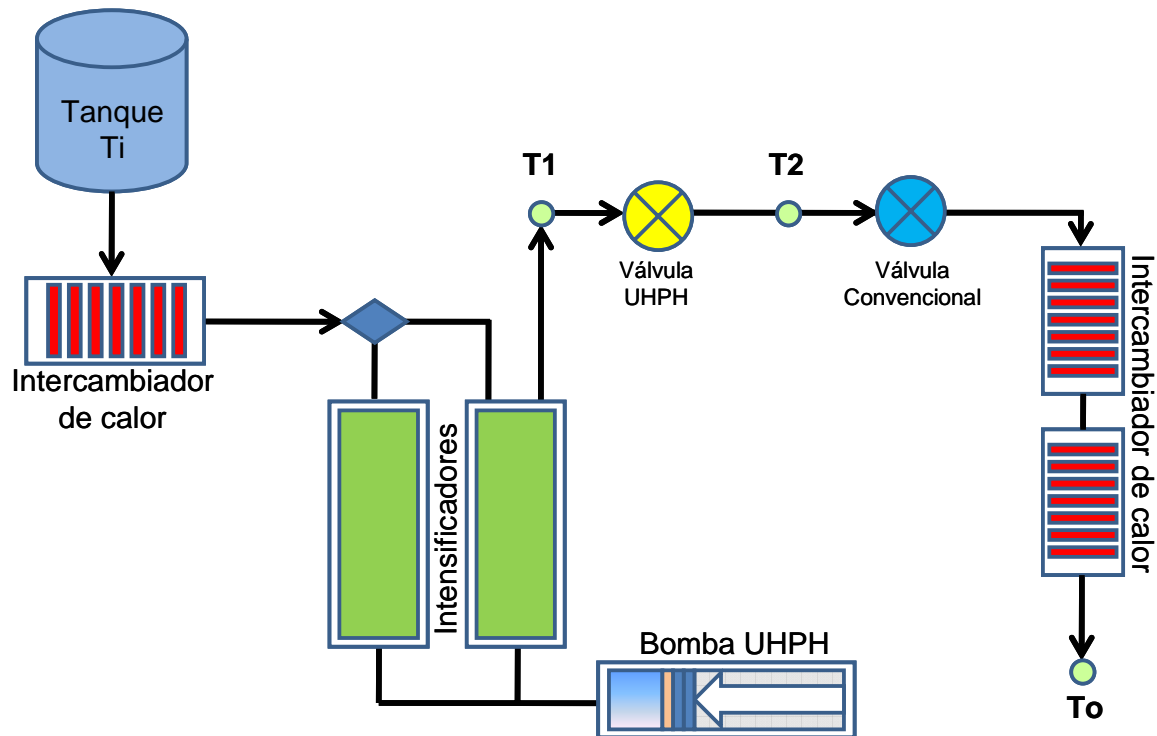
A pesar de que la configuración de la válvula parece ser sencilla, la fluidodinámica involucrada es bastante compleja. En la válvula de homogenización ocurren intensos cambios de energía cuando el líquido pasa de alta presión y baja velocidad (espacio de la válvula) a baja presión y alta velocidad (al pasar por el espacio de la válvula y fluir a través del asiento hacia la salida del homogenizador).

### 2.3.2. Incremento de la temperatura del fluido durante el tratamiento de UHPH

A pesar de que la tecnología de UHPH es considerada una tecnología alternativa a los tratamientos térmicos, durante el proceso de alta presión homogenización se produce un marcado incremento de la temperatura del producto debido: (1) al incremento de presión que ocurre en el intensificador y en la tubería situada antes de entrar a la válvula que generan una compresión del fluido y (2) a las fuerzas a las que es sometido el fluido al pasar por la válvula de alta presión y a la conversión de energía cinética en energía térmica (Bouaouina, Desrumaux, Loisel y Legrand, 2006; Hayes y Kelly, 2003a; 2003b; Picart, Thiebaud, René, Guiraud, Cheftel y Dumay, 2006; Thiebaud *et al.*, 2003).

En la Figura 5 se puede observar un esquema tipo de un equipo UHPH. Básicamente, el sistema de alta presión de un equipo UHPH consta de un par de intensificadores que trabajan con la ayuda de una bomba de alta presión. Dichos intensificadores están ensamblados a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de altas presiones. Además el equipo UHPH puede tener la posibilidad de utilizar una segunda válvula de homogenización a presiones reducidas. El intercambiador de calor colocado al comienzo cumple la función de precalentar la leche

a la temperatura deseada, mientras que el intercambiador ubicado al final del circuito tiene la misión de refrigerar rápidamente la leche de tal manera de minimizar la retención de temperatura. Mediante la utilización de sensores es posible efectuar durante los tratamientos un control de las principales temperaturas como la temperatura de entrada ( $T_i$ ), la temperatura antes de alcanzar la válvula de alta presión ( $T_1$ ), la temperatura antes de alcanzar la segunda válvula ( $T_2$ ) y la temperatura final tras refrigerar la leche ( $T_o$ ).



**Figura 5:** Esquema de un equipo tipo de ultra alta presión homogenización

Thiebaud *et al.* (2003) trabajando con leche utilizaron un equipo Stansted (FPG7400H, Stansted Fluid Power Ltd.) y observaron un incremento de la temperatura del fluido a la salida de la válvula ( $T_2$ ) de  $18,5^{\circ}\text{C}$  cada 100 MPa utilizando presiones entre 100 y 300 MPa y temperaturas de entrada del producto ( $T_i$ ) de 4, 14 y  $24^{\circ}\text{C}$ . El incremento de temperatura antes de entrar en la válvula ( $T_1 - T_i$ ), debido a la compresión, resultó ser función lineal de la presión de homogenización. Dicho incremento ( $2-3^{\circ}\text{C}$  cada 100 MPa), fue similar al descrito durante la compresión adiabática de soluciones proteicas tratadas por alta presión hidrostática (Kolakowski, Dumay y Cheftel, 2001). El mayor incremento de temperatura se produjo al pasar por la válvula UHPH ( $T_2 - T_1$ ) y corresponde a la disipación térmica de energía a medida que el fluido pasa a través del reducido espacio de la válvula.

Picart *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares utilizando el mismo equipo anteriormente mencionado. En este trabajo los autores estimaron en  $215 \pm 10$  ms el tiempo de residencia del producto a la mayor temperatura alcanzada T2, lo que demuestra que el tiempo de calentamiento en estos equipos es muy breve ( $< 1$  s) comparado con un tratamiento térmico de pasteurización. Bouaouina *et al.* (2006) trabajando con soluciones de aislados de proteínas de suero en un intervalo de presiones de 50 - 300 MPa y con una temperatura de entrada de 20°C observaron un aumento de 14°C cada 100 MPa. Hayes *et al.* (2005; 2003b) utilizando un equipo nm-GEN7400H (Stansted Fluid Power Ltd.) calcularon un incremento medio de temperatura de 17°C cada 100 MPa en un intervalo de presiones entre 50-200 MPa. Flourey *et al.* (2000) reportaron un incremento de 16,4°C cada 100 MPa en emulsiones aceite en agua (10%) a presiones de 20 a 300 MPa usando un equipo Stansted. En el caso de un mix de helado con 12% de grasa tratado por microfluidización, Feijoo, Hayes, Watson y Martin (1997) calcularon un incremento de 19,3°C cada 100 MPa en las condiciones de trabajo ensayadas.

No sólo se ha demostrado que existe un incremento lineal de la temperatura con el incremento de la presión sino que también se ha observado un incremento de la temperatura T2 con el incremento de la temperatura de entrada (Ti). Datta, Hayes, Deeth y Kelly (2005) presentaron valores de temperatura obtenidos en un equipo Stansted (nm-GEN7400H) con leche entera tratada a 200 MPa en los que la temperatura de salida T2 aumentó linealmente al incrementar la temperatura de entrada ( $0,5887^{\circ}\text{C}/^{\circ}\text{C}$ ).

Teniendo en consideración los diversos productos estudiados en los trabajos mencionados y el hecho de que la microfluidización y la tecnología de UHPH presenten grandes diferencias, es sorprendente, que ambos procesos generen un incremento similar en la temperatura. Parte del incremento térmico viene dado por el calentamiento adiabático, mientras que el mayor incremento de temperatura se debe a la energía cinética de las fuerzas de cizalla, cavitación, esfuerzo de corte y turbulencia que sufre el fluido al pasar por la válvula, parte de la cual será convertida en energía térmica en el producto.



## **2.4 Cambios en los componentes de la leche inducidos por el tratamiento térmico y por el tratamiento UHPH**

### **2.4.1. Reducción de la carga microbiana**

La leche es un excelente medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos beneficiosos, así como organismos causantes de deterioro y microorganismos patógenos cuyo desarrollo puede ocasionar toxiinfección y una pérdida de calidad del producto pudiendo incluso llegar a niveles que la inutilicen para su consumo o transformación.

Los principales grupos microbianos que se pueden encontrar en la leche son las bacterias ácido lácticas, coliformes, psicrótrofos, bacterias termodúricas y bacterias esporuladas (*Bacillus* spp. y *Clostridium* spp.) (Walstra, Wouters y Geurts, 2006b).

Las bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentran los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, producen ácido láctico fundamentalmente a partir de la lactosa y un tratamiento de pasteurización baja suele ser suficiente para eliminarlas.

Los coliformes pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, crecen rápidamente en la leche, especialmente por encima de los 20°C y degradan a las proteínas y lactosa produciendo gas y alterando el flavor de la leche. Un tratamiento de pasteurización suele ser suficiente para eliminarlos.

Los psicrótrofos, entre los cuales se incluye el género *Pseudomonas*, pueden proliferar aún a temperaturas de 4°C. La mayoría de estos microorganismos producen proteasas y lipasas que suelen ser altamente resistentes al calor de tal manera que pueden generar en la leche sabores anormales (rancio, jabonoso y pútrido) durante su almacenamiento (Sorhaug y Stepaniak, 1997).

Algunas bacterias termodúricas entre las que se encuentran *Microbacterium lacticum*, estreptococos termófilos y algunas especies de micrococos no forman esporas, pero sus células vegetativas sobreviven a procesos de pasteurización baja por lo que en condiciones de almacenamiento favorables pueden crecer y alterar la leche; sin embargo, en condiciones de refrigeración su crecimiento es muy limitado (Walstra *et al.*, 2006b).

La pasteurización es un tratamiento térmico que prolonga la vida útil de la leche líquida reduciendo el número de microorganismos alterantes y patógenos a niveles que no constituyan un riesgo para la salud. El proceso ha sido designado para destruir la mayoría de los patógenos más resistentes no formadores de esporas que se encuentran

en la leche cruda como *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes*. Con la pasteurización también se eliminan los coliformes y la mayoría de los psicrótrofos pero no un grupo de termodúricos entre los que se encuentran especies de *Micrococcus* spp., *Microbacterium lacticum*, streptococos termofílicos y bacterias formadores de esporas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Clostridium* spp. (Ryser, 2002).

Los tratamientos de esterilización, en envase y UHT, buscan eliminar todos los microorganismos patógenos y la mayoría de los microorganismos de deterioro, incluyendo las esporas. Las condiciones del tratamiento térmico para obtener leche esterilizada se basan en una reducción de la microbiota termofílica en 9 logaritmos (Hinrichs y Rademacher, 2004).

En cuanto a la tecnología de ultra alta presión homogenización, se han realizado numerosos estudios evaluándose tanto el mecanismo de inactivación de esta tecnología sobre diferentes microorganismos, así como los factores involucrados en la inactivación microbiana.

#### **2.4.1.1 Mecanismo de inactivación de la UHPH sobre los microorganismos**

Hasta el momento existe una gran controversia en la literatura acerca de la/s causa/s que provoca/n la destrucción microbiana en un equipo de alta presión por homogenización. Durante el tratamiento de UHPH se aplica presión a un fluido que es forzado a pasar a través de una válvula causando así un incremento de la velocidad de flujo y una repentina pérdida de presión. De esta manera, las células experimentan una serie de fuerzas y se rompen a través de su interacción con el fluido y las paredes de la válvula. Middelberg (1995) realizó una revisión de los posibles procesos físicos implicados en la ruptura microbiana durante la homogenización a alta presión. Entre los mecanismos de ruptura celular propuestos se encuentran: la repentina caída de presión, fuerzas de corte y de torsión, turbulencia y más probablemente la cavitación (Shirgaonkar, Lothe y Pandit, 1998), y las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de gas durante la aplicación de la UHPH. El incremento de temperatura alcanzado por el producto después de pasar por la válvula también puede tener un efecto destructivo sobre la inactivación microbiana (Hayes *et al.*, 2005).

### **2.4.1.2 Factores que afectan la inactivación de microorganismos tratados por UHPH**

#### *Tipo de microorganismo (forma y composición de la pared)*

A finales de los años 70 Kelemen y Sharpe (1979) dieron a conocer que la forma del microorganismo y la composición de la membrana externa son dos de los principales factores que influyen en la facilidad con que las células pueden romperse. De las especies estudiadas, los bacilos fueron destruidos más fácilmente que los cocos pero además, dentro de los bacilos, una bacteria Gram-negativa como *Escherichia coli* resultó ser menos resistente que una Gram-positiva como *Bacillus subtilis* indicando el efecto de la composición de la pared celular sobre la inactivación microbiana.

Al aplicar presión se produce un aumento de la permeabilidad o la ruptura de la membrana celular causando la muerte celular e impidiendo una regeneración o reactivación de la célula como ocurre con la alta presión hidrostática (Vachon *et al.*, 2002). Es sabido, a partir de estudios previos (Popper y Knorr, 1990), que la pared celular de las bacterias Gram-positivas es más rígida que la de las Gram-negativas. Esto se debe a la gruesa capa de peptidoglicanos constituida por una serie de cadenas de glicanos compuestos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$ . Estas cadenas son paralelas y se entrecruzan por medio de enlaces peptídicos formados entre cadenas laterales de aminoácidos (Verwer, Nanninga, Keck y Schwarz, 1978). En el caso de bacterias Gram-positivas esta capa de peptidoglicanos representa aproximadamente un 90% del peso seco de la pared mientras que, en el caso de bacterias Gram-negativas, sólo representa un 10%. Debido a la importancia de esta capa de peptidoglicanos, Middelberg y O'Neill (1993) desarrollaron un modelo para la disrupción de *Escherichia coli* por UHPH en el que la fuerza efectiva media se correlacionó con el entrecruzamiento de peptidoglicanos. Estudios realizados por Wuytack, Diels y Michiels (2002) y por Vachon *et al.* (2002) utilizando un equipo de alta presión Emulsiflex-C5 en un intervalo de presiones de 100 a 300 MPa y con una  $T_i = 25^\circ\text{C}$  confirmaron el hecho de que bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria innocua* y *Leuconostoc dextranicum* presentan mayor resistencia a la alta presión homogenización, que bacterias Gram-negativas como *Salmonella enterica* variedad *typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, Briñez, Roig-Sagués, Hernández-Herrero y Guamis (2006b; 2006c) obtuvieron resultados contrarios trabajando a 300

MPa y etapa doble a 30 MPa con temperaturas de entrada de 6 y 20°C (DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd.) no detectando diferencias en los niveles de inactivación de *L. innocua* y *E. coli*.

Algunas especies de microorganismos formadores de esporas son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración y las esporas formadas pueden sobrevivir incluso a tratamientos UHT utilizados en la industria láctea. El efecto del tratamiento de UHPH sobre las esporas, específicamente sobre esporas de *Bacillus licheniformis*, fue estudiado por Feijoo *et al.* (1997) en helado inoculado con una suspensión de esporas y sometido a un intervalo de presiones entre 50 y 200 MPa (M-210-EH, Microfluidics Internacional Corp.). Estos autores observaron que el número de esporas se redujo al incrementar la presión, sin embargo, no se logró la eliminación completa.

La inactivación de esporas formadas por *Alicyclobacillus acidoterrestris*, microorganismo normalmente encontrado en jugos de fruta, fue estudiada por Bevilacqua, Cibelli, Corbo y Sinigaglia (2007) en un equipo Panda (Niro Soavi). A presiones máximas de 170 MPa se obtuvieron porcentajes de inactivación de 20-50% dependiendo de la cepa, resultados que concuerdan con los obtenidos por Feijoo *et al.* (1997) a 150 MPa.

En cuanto al efecto de la UHPH sobre la forma del microorganismo existen resultados muy contradictorios. Saboya, Maillard y Lortal (2002) reportaron una mayor resistencia de los cocos frente a los bacilos siendo suficiente un pase a 50 MPa para inactivar el 80% de las células de *Lactobacillus* spp, mientras que para alcanzar la misma eficiencia en el caso de *Lactococcus lactis* y *Propionibacterium freundenreichii* (morfología compleja) se necesitó una presión de 200 MPa. Sin embargo, Wuytack *et al.* (2002) en un intervalo de presiones de 200-300 MPa observaron una mayor resistencia de bacilos, presentando *Lactobacillus plantarum* mayor resistencia a los tratamientos que *Leuconostoc dextranicum*.

La UHPH también ha sido utilizada para inactivar fagos obteniéndose niveles de inactivación similares a los obtenidos para microorganismos patógenos (Vachon *et al.*, 2002). Sin embargo, un estudio llevado a cabo por Moroni, Jean, Autret y Fliss (2002) mostró que los bacteriófagos que infectan a los lactococos son más resistentes a la UHPH que las bacterias, especialmente que las bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Salmonella* spp. para las que se obtuvo una inactivación de más de 8 ciclos logarítmicos a 200 MPa y 5 pases comparado con 4,9 para los bacteriófagos. Según los autores, esta mayor resistencia puede estar asociada con el hecho de que los bacteriófagos que

infectan a los lactococos tienen un tamaño muy pequeño (~ 60 nm) comparado con el de la mayoría de las bacterias (400 nm).

#### *Temperatura de entrada (Ti) de la muestra*

El estado físico de los lípidos y proteínas de la membrana celular está íntimamente relacionado con el efecto que pueda tener la presión sobre las células y depende fundamentalmente de la temperatura. A temperatura ambiente, los lípidos en las membranas biológicas se encuentran en un estado líquido-cristalino que provee la máxima permeabilidad y flexibilidad. A bajas temperaturas (2-10°C) se produce la cristalización de los fosfolípidos y la membrana celular se vuelve rígida. Por el contrario, a temperaturas superiores a 40°C, los enlaces hidrofóbicos se debilitan dando menor resistencia a la membrana frente a la alta presión homogenización (Vachon *et al.*, 2002). Thiebaud *et al.* (2003) estudiaron la inactivación de microorganismos en leche a diferentes presiones (200-300 MPa) y temperaturas de entrada (4, 14 y 24°C) en un equipo Stansted (FPG7400H) observando que al aumentar la temperatura, la tasa de inactivación aumenta. A 300 MPa se observó una diferencia de 2 unidades logarítmicas en la reducción microbiana entre las muestras tratadas a 4 y 24°C. El efecto del aumento de la Ti sobre la inactivación microbiana ha sido probado en diferentes estudios realizados por Briñez *et al.* (2007; 2006a; 2006b; 2006c) (equipo Stansted, modelo DRG FPG 7400H:350) en leche y zumo de naranja a Ti = 6 y 20°C. Estos autores estudiaron cepas de *E. coli*, *L. innocua* y *S. aureus*, y en todos los casos se comprobó la mayor eficacia del tratamiento UHPH a 20°C.

#### *Tipo de matriz*

Estudios llevados a cabo por Vachon *et al.* (2002) han mostrado que la matriz puede afectar el grado de inactivación microbiana. En dicho trabajo se inoculó *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en dos matrices diferentes (leche y buffer) observándose que el grado de inactivación de los patógenos fue significativamente menor en leche que en buffer. Estos autores sugieren que dicha diferencia podría deberse a que los componentes de la leche ofrecen protección hacia la alta presión homogenización. Más recientemente, estudios llevados a cabo en nuestros laboratorios por Briñez *et al.* (2007; 2006b) ratificaron el importante efecto de la matriz sobre la inactivación microbiana. En estos trabajos se compararon valores de letalidad de *L. innocua* y de *Staphylococcus* spp. en leche y zumo de naranja, siendo la inactivación

para ambos microorganismos mayor en el caso de la leche. También se ha evaluado el efecto de la cantidad de grasa en la leche frente al tratamiento de UHPH observándose que tratamientos de UHPH en leche con distintos porcentajes de grasa mostraron diferentes niveles de reducción de la carga microbiana. Se detectó un nivel de inactivación de 4, 3 y 2 unidades logarítmicas de *L. innocua* en leche tratada a 200 MPa ( $T_i = 28^\circ\text{C}$ ) con 0, 2 y 3,4 % de grasa, respectivamente (Kheadr, Vachon, Paquin y Fliss, 2002). En este caso los autores sugieren que la grasa puede ejercer cierta protección frente al tratamiento UHPH. Al contrario, en otro trabajo (Briñez *et al.* 2006c) se evaluó la letalidad de dos cepas de *E. coli* inoculadas en leches UHT entera y desnatada tratadas a 300 MPa con efecto de una segunda válvula de homogenización (30 MPa) y  $T_i = 6$  y  $20^\circ\text{C}$ , y se observó una mayor inactivación microbiana en la leche entera que en la desnatada a ambas  $T_i$ . Las discrepancias entre autores podrían deberse a diferencias entre las  $T_i$ , matrices y equipos de alta presión homogenización utilizados lo que demuestra que el rol de la grasa asociado a la baro-resistencia de los microorganismos necesita ser más estudiado.

También en este contexto debe tenerse en consideración que dependiendo de la matriz, la viscosidad del fluido será diferente. Diels, Callewaert, Wuytack, Masschalck y Michiels (2005) mostraron que existe una relación inversamente proporcional entre la viscosidad y la inactivación microbiana, lo que podría explicarse por una menor cavitación y turbulencia en fluidos viscosos.

#### *Nivel de presión y número de pases*

Los estudios de inactivación de diversos microorganismos (inoculados o propios), llevados a cabo sobre diferentes matrices y utilizando diferentes equipos de UHPH, han mostrado que al incrementar la presión y el número de pases se alcanza mayor inactivación microbiana (Diels, Wuytack y Michiels, 2003; Picart *et al.*, 2006; Thiebaud *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2002; Wuytack *et al.*, 2002). Esta mayor inactivación asociada con el aumento de número de pases del fluido a través del homogenizador se debe principalmente a un efecto acumulativo del tiempo de residencia del fluido en la válvula de alta presión.

#### *Carga inicial*

Moroni *et al.* (2002) observaron que al incrementar la concentración inicial de bacteriófagos, el tratamiento de UHPH es menos efectivo. En este estudio con una

concentración inicial de  $10^8$  ufc/mL se obtuvo una reducción de 1,5 logaritmos a 200 MPa mientras que con una concentración de  $10^7$  ufc/mL se obtuvo una reducción de 2,6 logaritmos. Vachon *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares al inactivar microorganismos patógenos; la inactivación completa de *L. monocytogenes* se alcanzó sólo cuando la concentración bacteriana inicial no excedió de  $10^4$  ufc/mL mientras que con una concentración inicial de  $10^9$  ufc/mL sólo se produjo una reducción de 2 unidades logarítmicas.

### *Inhibidores*

Actualmente existe un gran interés dentro de la industria alimentaria en utilizar compuestos antimicrobianos naturales como aldehídos, cetonas, ésteres o enzimas naturales como la lisozima, el sistema lactoperoxidasa o la lactoferrina. Vannini, Lanciotti, Baldi y Guerzoni (2004) evaluaron el efecto de la UHPH sobre la actividad de la lisozima y lactoperoxidasa en un grupo diverso de bacterias Gram-positivas y negativas inoculadas en leche desnatada. Según los autores la UHPH y las enzimas antimicrobianas actúan de forma sinérgica sobre los microorganismos estudiados lo que puede deberse fundamentalmente a tres factores: (1) el efecto directo de la presión sobre la integridad del microorganismo, (2) la mayor facilidad de entrada de las enzimas a través de las membranas dañadas y (3) un efecto indirecto del proceso sobre las moléculas de la enzima, es decir que, ya que la actividad de una enzima se debe a su estructura tridimensional, pequeños cambios que afecten los sitios activos pueden inducir un aumento o disminución de su actividad. Diels, De Taeye y Michiels (2005) comprobaron la eficacia del efecto combinado del tratamiento UHPH con la lisozima y nisina hacia *E. coli* cuando estas enzimas fueron añadidas antes del tratamiento UHPH; sin embargo, estos autores no encontraron el efecto sinérgico con la lactoperoxidasa mencionado por Vannini *et al.* (2004). Unos años después Iucci, Patrignani, Vallicelli, Guerzoni y Lanciotti (2007) estudiaron el efecto de la alta presión homogenización a 100 MPa (Panda, Niro Soavi) sobre la actividad de la lisozima y lactoferrina en *L. monocytogenes* inoculada en leche, indicando que la actividad de las enzimas fue mejorada o acelerada por el tratamiento de alta presión homogenización.

#### **2.4.1.3 Inactivación de la microbiota nativa de la leche**

Varios autores han estudiado a lo largo de los últimos años la posible aplicación de la UHPH para lograr la inactivación de la microbiota nativa de la leche minimizando

los efectos adversos del tratamiento térmico. Hayes y Kelly (2003b) alcanzaron una inactivación del recuento de mesófilos totales de ~ 90 % en leche entera a una presión de 200 MPa y  $T_i = 10^\circ\text{C}$  (nm-GEN7400H). En un estudio similar Thiebaud *et al.* (2003) utilizando condiciones más severas (200-300 MPa,  $T_i = 4, 14$  y  $24^\circ\text{C}$ ) evaluaron tras el tratamiento UHPH la microbiota total, microorganismos resistentes al calor, psicrótrofos, halotolerantes y lactobacilos. Las tasas de inactivación aumentaron al aumentar la presión y la temperatura de entrada. A 200 MPa y  $T_i = 24^\circ\text{C}$  se produjo una reducción de ~1 unidad logarítmica en la microbiota endógena total, mientras que a 300 MPa a la misma temperatura de entrada se alcanzó una reducción de casi 3 unidades logarítmicas. Dos y tres pases a la misma presión generaron un incremento aditivo de la tasa de inactivación microbiana. Picart *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares en cuanto a mesófilos totales trabajando en las mismas condiciones de presión y temperatura. En un estudio llevado a cabo por Hayes *et al.* (2005), además de evaluarse los mesófilos totales se evaluó la inactivación de coliformes y *Staphylococcus aureus* los cuales fueron completamente eliminados por todos los tratamientos UHPH aplicados (150-250 MPa,  $T_i = 45^\circ\text{C}$ ). En nuestros laboratorios se ha evaluado la calidad microbiológica de leche de cabra tratada en un intervalo de presiones de 100-300 MPa con  $T_i = 30$  y  $40^\circ\text{C}$  utilizando un equipo Stansted (FPG11300). Los recuentos obtenidos en este estudio mostraron que el tratamiento a 100 MPa no fue efectivo para reducir la población microbiana mientras que los tratamientos a 200 y 300 MPa mostraron una eficiencia del 99,9% en la reducción de mesófilos totales, psicrótrofos y lactococos. En estos últimos tratamientos los lactobacilos, enterococos y enterobacterias fueron completamente eliminados (Joan Miquel Quevedo, comunicación personal). Smiddy, Martin, Huppertz y Kelly (2007) estudiaron la vida útil de leche entera tratada por UHPH a presiones de 200 y 250 MPa en la primera etapa y de 5 MPa en la segunda etapa con temperaturas de entrada de 55 y  $70^\circ\text{C}$  utilizando un equipo Stansted (nm-GEN7400H). Los niveles de mesófilos totales, psicrótrofos, *Pseudomonas* spp., coliformes, lactobacilos, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* fueron analizados a lo largo del almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  durante 14 días. Inmediatamente después del tratamiento UHPH, los recuentos de todos los grupos microbianos estudiados se situaron por debajo del límite de detección, sin embargo, al día 14 los recuentos de bacterias totales, psicrótrofos y *Pseudomonas* spp. alcanzaron valores de  $10^8$  ufc/mL en todas las muestras tratadas por UHPH. De hecho, entre el día 4 y 7 de almacenamiento los recuentos de psicrótrofos superaron el límite legal establecido por la normativa



Europea ( $n = 5$ ,  $c = 1$ ,  $m = 5 \times 10^4$ ,  $M = 5 \times 10^5$ ) para leche pasteurizada (Directiva Europea 92/46/EEC, 1992). Sin embargo, en este trabajo se observó un crecimiento de coliformes a lo largo del almacenamiento, indicador de medidas higiénicas pobres, que pudo afectar los resultados obtenidos.

#### **2.4.2. Activación / inactivación de enzimas**

La leche contiene más de 60 enzimas endógenas de naturaleza proteica propias de la leche o secretadas por microorganismos, algunas de las cuales tienen importantes aplicaciones tecnológicas relacionadas con el flavor, la textura y la estabilidad de los productos lácteos (Farkye y Imafidon, 1995).

A pesar de que tradicionalmente la leche se trata térmicamente para garantizar la seguridad microbiológica, los tratamientos térmicos también influyen sobre la actividad de las enzimas endógenas provocando una activación o inactivación enzimática reversible o irreversible. La mayoría de las enzimas endógenas de la leche, salvo pocas excepciones, tienen efectos negativos sobre las propiedades organolépticas y nutricionales de la leche, por lo que uno de los principales objetivos de los tratamientos térmicos suele ser lograr la inactivación de dichas enzimas.

Aquí consideraremos sólo las principales enzimas que actúan en la estabilidad de la leche y algunas que puedan ser utilizadas como indicadores del tratamiento térmico. Este grupo de enzimas comprende la lipoproteína lipasa, plasmina, fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa.

##### **2.4.2.1 Enzimas endógenas**

La *lipoproteína lipasa (LPL; EC 3.1.1.3)* es la lipasa de la leche que se encuentra mayoritariamente (>90%) unida a las micelas de caseína, mientras que los triglicéridos, sustratos de esta enzima, se encuentran en los glóbulos grasos rodeados por la membrana de dicho glóbulo graso (MFGM).

La LPL es probablemente la enzima más importante en lo que se refiere a la estabilidad de la leche ya que su actividad conduce a la rancidez hidrolítica en la leche cuando se produce el daño de la MFGM debido a operaciones de agitación, homogenización o congelación de la leche. La LPL es inestable y sensible a la luz ultravioleta, al ácido y al calor (Shakeel-ur-Rehman y Farkye, 2004b). Es una enzima relativamente termolábil que es inactivada en gran medida por un tratamiento de

pasteurización HTST (72°C y 15 s) o completamente mediante un tratamiento de 78°C y 10 s, por lo que, la LPL no suele causar lipólisis en la leche pasteurizada (Deeth, 2006).

Sin embargo, la LPL aparentemente no se inactiva, o sólo lo realiza en pequeño porcentaje, a presiones por debajo de 200 MPa y temperaturas de entrada entre 6-10°C (Hayes *et al.*, 2005; 2003b), lo que favorece que ocurran fenómenos de lipólisis durante el almacenamiento de leches tratadas en estas condiciones. En leche tratada a 200 MPa, con diferentes temperaturas de entrada entre 10 y 50°C, Datta *et al.* (2005) observaron una inactivación completa de la LPL cuando la leche alcanzó una temperatura de salida superior a 71°C. En este estudio el tratamiento de UHPH no causó más inactivación de la LPL que el tratamiento térmico equivalente y cuando la temperatura máxima alcanzada fue de 57°C generó una activación de la enzima (240% de actividad comparado con el control).

La *plasmina* o *proteasa alcalina* (PL; EC 3.4.21.7) es la principal enzima proteolítica de la leche y muestra una actividad óptima a pH 7,5 (Nielsen, 2004). En la leche forma parte de un sistema complejo consistente de plasmina, su zimógeno inactivo plasminógeno, activadores del plasminógeno, inhibidores de la plasmina e inhibidores del plasminógeno. La mayoría de la plasmina en la leche natural se encuentra en la forma de plasminógeno inactivo (Fox y McSweeney, 1998a).

La plasmina, que es bastante estable al calor ya que sobrevive parcialmente el proceso térmico UHT, puede hidrolizar las proteínas de la leche generando un flavor amargo y produciendo la gelificación de las leches esterilizadas (Walstra, Wouters y Geurts, 2006c).

Los diferentes componentes del sistema plasmina reaccionan de manera diferente frente a los tratamientos térmicos. Tanto la plasmina como el plasminógeno son relativamente estables a los tratamientos térmicos, especialmente en ausencia de la  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) (Nielsen, 2004).

La pasteurización de la leche a 72°C y 15 s disminuye la actividad de la plasmina sólo en un 17% (Richardson, 1983) probablemente debido a la formación de puentes disulfuro entre la enzima y la  $\beta$ -Lg desnaturalizada por el tratamiento térmico (Metwalli, de Jongh y van Boekel, 1998). Sin embargo, durante el almacenamiento se produce un incremento de la actividad enzimática posiblemente debido a la inactivación de los inhibidores de plasmina y/o incremento de la actividad de los activadores del plasminógeno (Richardson, 1983), transformándose el plasminógeno en plasmina.

En el caso de tratamientos térmicos a temperaturas más elevadas (tratamiento UHT) la inactivación de la plasmina es más dependiente del tiempo que de la temperatura (Farkye y Imafidon, 1995). Tanto la plasmina como el plasminógeno son poco afectados por las condiciones de pasteurización y sobreviven parcialmente el tratamiento UHT. Algunos valores del tiempo de reducción decimal (D) obtenidos en diferentes estudios para la plasmina son de 35,7 y 12,4 min a 72,5°C y de 7 y 10 s a 142°C (Nielsen, 2004). Los activadores del plasminógeno son más estables que la plasmina y que el plasminógeno, por lo que no son inactivados en condiciones de pasteurización y sobreviven las condiciones utilizadas en el tratamiento UHT (Nielsen, 2004). Finalmente, los inhibidores de los activadores del plasminógeno son menos estables al tratamiento térmico que los inhibidores de la plasmina, lo cual indica que la activación del plasminógeno podría sobrepasar la inhibición de plasmina producida tras un proceso de pasteurización (Prado, Sombers, Ismail y Hayes, 2006).

Hayes y Kelly (2003a) estudiaron el efecto del tratamiento UHPH sobre la actividad de la plasmina a presiones inferiores a 200 MPa y con  $T_i = 7 - 9^\circ\text{C}$  observando que estos tratamientos reducen la actividad de la plasmina, aunque dichas muestras de leche retuvieron aproximadamente un 35 % de su actividad original. En este trabajo, la máxima temperatura alcanzada en los tratamientos fue de 54 °C mientras que según datos reportados por Metwalli *et al.* (1998) la temperatura mínima requerida para inactivar la enzima es de 65°C. Por ello, los autores sugirieron que tanto la inactivación de la plasmina como del plasminógeno pudo deberse a una combinación de las fuerzas generadas en el equipo UHPH junto al ligero incremento de la temperatura, observaciones que posteriormente fueron confirmadas por Datta *et al.* (2005). En otro estudio de este mismo grupo de investigadores se observó que al incrementar la temperatura de entrada del producto a 45°C se alcanzan mayores tasas de inactivación de la plasmina (85 y 95 % para 150 y 250 MPa, respectivamente) debido a la mayor temperatura alcanzada (Hayes *et al.*, 2005).

La *fosfatasa alcalina* (ALP; EC 3.1.3.1) se encuentra mayoritariamente en la MFGM. Es una enzima de importancia tecnológica ya que la determinación de su actividad en leche es utilizada como indicador de la eficacia del tratamiento térmico de pasteurización baja. Esta enzima es relativamente termolábil pues su resistencia a los tratamientos térmicos es ligeramente superior que la de los microorganismos patógenos

no formadores de esporas que pudiesen estar presentes en la leche (Farkye y Imafidon, 1995).

La inactivación de la enzima asegura que todas las formas no esporuladas de microorganismos patógenos y la mayoría de las bacterias ácido lácticas y bacilos Gram-negativos se han eliminado durante el tratamiento térmico. Sin embargo, aunque la ALP es usada universalmente como indicador de la eficacia del tratamiento de pasteurización, se ha visto que no es la enzima más apropiada debido a que puede reactivarse bajo ciertas condiciones complicando la interpretación de los resultados y a que la enzima puede inactivarse completamente en condiciones térmicas inferiores como 70°C y 16 s (Shakeel-ur-Rehman y Farkye, 2004c). La reactivación tiende a ocurrir cuando la leche es expuesta durante unos pocos segundos a altas temperaturas (80 - 180°C) seguido de un almacenamiento entre 5 y 40°C (Shakeel-ur-Rehman, Fleming, Farkye y Fox, 2003). Se ha observado que la leche UHT es fosfatasa negativa inmediatamente del tratamiento térmico pero que durante el almacenamiento da positiva a la prueba de la fosfatasa; no obstante en la leche HTST no se produce tal reactivación (Shakeel-ur-Rehman y Farkye, 2004c). Esto puede deberse a que, en general, la reactivación de la ALP aumenta al aumentar la temperatura del tratamiento térmico y al disminuir el tiempo de retención a dicha temperatura y además suele estar relacionada con la presencia de grupos sulfidrilos (SH).

Se ha mostrado que leches tratadas por UHPH a presiones entre 50 y 200 MPa y con  $T_i = 6 - 9^\circ\text{C}$  dan resultados positivos de ALP al utilizar un ensayo cualitativo (Hayes y Kelly, 2003a), aunque el ensayo utilizado no permitió conocer si hubo inactivación parcial de la enzima. Hayes *et al.* (2005) utilizando ensayos cuantitativos para la ALP en muestras de leche tratadas entre 150 y 250 MPa y con  $T_i = 45^\circ\text{C}$ , observaron que el grado de inactivación de la ALP aumentó con el aumento de la presión siendo del 71, 98 y 100 % para los tratamientos de 150, 200 y 250 MPa, respectivamente. En otro estudio llevado a cabo en leche tratada a 200 MPa y con diferentes temperaturas de entrada (10 - 50°C) se observó la completa inactivación de la enzima cuando se alcanzó una temperatura de 75°C, mientras que el inicio de la inactivación se dio a una temperatura de 60°C (Datta *et al.*, 2005). Un estudio más reciente efectuado por Picart *et al.* (2006) mostró que a temperaturas inferiores a 58°C, un tratamiento UHPH a presiones entre 100 y 250 MPa induce una ligera activación de la enzima; por el contrario a temperaturas superiores a 60°C la enzima fue completamente inactivada. Existen opiniones contrarias entre los diferentes trabajos

existentes en cuanto al fenómeno implicado en la inactivación de la ALP; ciertos datos indican que la inactivación se debe fundamentalmente al incremento de la temperatura (Datta *et al.*, 2005), mientras que otros sugieren que la inactivación de la enzima es un efecto combinado de las fuerzas mecánicas y el incremento de la temperatura (Hayes y Kelly, 2003a).

La *lactoperoxidasa* (LP; EC 1.11.1.7) es la enzima más representativa dentro de las antibacterianas. Su efecto antibacteriano se debe a que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede catalizar la oxidación de tiocianato a hipotiocianito y otros oxiácidos, los cuales pueden inhibir ciertas bacterias (Fox y McSweeney, 1998a). La leche es rica en lactoperoxidasa y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser producido metabólicamente por bacterias ácido lácticas, sin embargo el factor limitante del sistema lactoperoxidasa en la leche es el tiocianato cuya concentración depende ampliamente de la alimentación del animal (Bjorck, Rosén, Marshall y Reiter, 1975).

La LP es una enzima relativamente resistente al tratamiento térmico ya que durante un tratamiento HTST pierde aproximadamente sólo un 30% de su actividad (Shakeel-ur-Rehman y Farkye, 2004a), y es usada como índice de pasteurización alta. Marín, Sánchez, Pérez, Puyol y Calvo (2003) observaron que la LP pierde su actividad muy lentamente por debajo de los 70°C y que a 72°C se produce un incremento en la tasa de inactivación. Esto conduce a que la LP sea más resistente a tratamientos largos a bajas temperaturas (68°C y 15 min) que a tratamientos cortos a altas temperaturas (74 - 76°C y 40 s).

Hayes *et al.* (2005) mostraron que leches tratadas por UHPH a presiones de 150, 200 y 250 MPa con  $T_i = 45^\circ\text{C}$  retuvieron un 91, 34 y 0 %, respectivamente de la actividad de la LP. Por otra parte, muestras de leche tratadas a 200 MPa con temperaturas de entrada entre 10 y 50°C mostraron una inactivación completa de la enzima cuando la muestra alcanzó una temperatura de 80°C, correspondiéndose con una temperatura de entrada de 50°C (Datta *et al.*, 2005). Sin embargo, no hay concordancia entre ambos estudios acerca del efecto asociado a la inactivación de la enzima. Según Hayes *et al.* (2005) la inactivación de la LP se debe principalmente al efecto del tratamiento térmico, mientras que según Datta *et al.* (2005) el efecto principal es el debido a las fuerzas generadas durante el tratamiento UHPH.

#### 2.4.2.2 *Enzimas de la microbiota psicrótrófa*

Además de las enzimas endógenas de la leche, ésta puede contener importantes niveles de proteasas y lipasas provenientes de la microbiota endógena, principalmente de microorganismos psicrótrofos como *Pseudomonas fluorescens* los cuales pueden producir proteasas, lipasas y fosfolipasas C termorresistentes (Stepaniak y Sorhaug, 1995).

La mayoría de las proteasas de microorganismos psicrótrofos son capaces de hidrolizar las caseínas  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ - y  $\beta$ - mientras que su actividad sobre las proteínas del suero es baja (Sorhaug y Stepaniak, 1997).

Las proteasas, lipasas y fosfolipasas producidas por microorganismos psicrótrofos suelen ser estables a elevadas temperaturas pudiendo soportar tratamientos de pasteurización e incluso tratamientos UHT. Si la leche cruda de partida contiene un elevado número de microorganismos psicrótrofos, las cantidades de proteasas y lipasas que sobrevivan el tratamiento térmico serán suficientes para causar defectos en el flavor de la leche como amargor, rancidez y podría producirse también gelación (Fox y McSweeney, 1998b).

Hayes *et al.* (2005) estudiaron el efecto del tratamiento UHPH sobre la actividad de la proteasa extracelular de *Pseudomonas fluorescens*. La inactivación de la enzima fue observada a presiones superiores a 200 MPa, obteniéndose un 20 y 30% a 200 y 250 MPa, respectivamente. Debido a que dicha proteasa es muy estable al tratamiento térmico los autores han sugerido que la inactivación puede deberse al efecto del estrés experimentado por la enzima durante el tratamiento.

Estudios efectuados por Fajardo-Lira, Oria, Hayes y Nielsen (2000) sobre proteasas de *Pseudomonas fluorescens* han mostrado que la acción de estas proteasas sobre la micela de caseína produce desestabilización de la micela junto con la liberación de plasmina desde la fracción caseínica hacia el suero. Esto podría tener un impacto negativo sobre la producción de quesos incrementando el tiempo de maduración ya que parte de la plasmina puede ser inhibida por la  $\beta$ -Lg (Bastian y Brown, 1996).

#### 2.4.3. *Materia grasa*

Como se puede observar en la Tabla 4 la materia grasa de la leche está constituida principalmente por triglicéridos y fosfolípidos, aunque también podemos encontrar pequeñas cantidades de lípidos más complejos.

**Tabla 4:** Composición lipídica de la leche (Walstra *et al.*, 2006c)

Tipo de lípido	Porcentaje en la grasa de la leche (% p/p)
Glicéridos neutros	98,7
<i>Triglicéridos</i>	98,3
<i>Diglicéridos</i>	0,3
<i>Monoglicéridos</i>	0,03
Ácidos grasos libres	0,1
Fosfolípidos	0,8
Cerebrósidos	0,1
Gangliósidos	0,01
Esteroles	0,32
<i>Colesterol</i>	0,30
<i>Colesteril ésteres</i>	0,02
Carotenoides + Vitamina A	0,002

#### 2.4.3.1 El glóbulo graso

Los lípidos en la leche se encuentran en forma de glóbulos grasos emulsionados en la fase acuosa, con un diámetro variable entre 0,1 y 20  $\mu\text{m}$ , y con un valor medio de 3-5  $\mu\text{m}$ .

El centro de los glóbulos grasos está constituido principalmente por lípidos no polares como triglicéridos, ésteres de colesterol y ésteres de retinol los cuales se encuentran recubiertos por la membrana del glóbulo graso (MFGM). Dicha membrana está formada de diferentes compuestos, esencialmente fosfolípidos, lípidos neutros, cerebrósidos, colesterol y proteínas, algunas de las cuales son enzimas. Los fosfolípidos son principalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina. Tanto los fosfolípidos como los cerebrósidos son ricos en ácidos grasos insaturados, de tal manera que la MFGM contiene mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que la grasa de la leche y por lo tanto, es más susceptible de sufrir oxidación. En cuanto a las proteínas que forman parte de la MFGM, éstas son glicoproteínas específicas de membrana que contienen hexosas, hexosaminas y ácido siálico.

#### 2.4.3.2 Estabilidad de la emulsión grasa

La estabilidad de la emulsión se debe a la existencia de la membrana envolvente lípido-proteica que asegura la repulsión electrostática entre los diferentes glóbulos

grasos, por lo que es fundamental la integridad de dicha membrana para mantener la estabilidad.

De manera general las emulsiones de lípidos suelen ser inestables debido a dos factores. Uno de ellos es la diferencia de densidad entre la fase acuosa y la fase lipídica que según la ley de Stokes lleva a que los glóbulos grasos asciendan de manera espontánea y formen una capa de grasa. El otro factor asociado a la inestabilidad de la emulsión es la tensión interfacial entre la fase acuosa y la fase grasa. Cuando dos glóbulos chocan, estos se pueden adherir (floculación) o pueden coalescer debido al principio de Laplace que postula que la presión es mayor dentro de glóbulos pequeños que dentro de grandes y por lo tanto habrá una tendencia a que los glóbulos de gran tamaño crezcan a expensas de los más pequeños (Fox y McSweeney, 1998c).

El proceso de separación espontánea de la grasa será mucho más rápido cuanto mayor sea la disparidad en el tamaño de los glóbulos grasos y cuanto menor sea la temperatura; es por eso que la emulsión de la materia grasa se estabiliza mediante la reducción mecánica del tamaño de los glóbulos, que se consigue mediante la homogenización (Luquet, Keilling y De Wilde, 1991).

#### ***2.4.3.3 Cambios físicos y químicos en el glóbulo graso***

Las propiedades funcionales de la MFGM están asociadas a su composición química y estructura física. Sin embargo, debido al tratamiento tecnológico (homogenización y tratamiento térmico) se pueden producir una serie de cambios físicos y químicos en la MFGM que podrán afectar la estabilidad del mismo.

##### *Estabilidad física del glóbulo graso*

Durante la homogenización, el glóbulo graso nativo se rompe y se forman nuevos glóbulos más pequeños de mayor área superficial que ya no pueden ser protegidos completamente por la MFGM.

Dependiendo del orden en que se produzcan los tratamientos de homogenización y calentamiento la composición de la nueva membrana podrá variar. Cuando la homogenización se produce previa al tratamiento térmico, las micelas de caseína que se encuentran semiintactas o los fragmentos micelares cubren la interfase de las nuevas gotas de grasa y a la vez, las proteínas del suero desnaturalizadas se unen a las proteínas nativas de la MFGM y se adsorben a las caseínas vía enlaces disulfuro (Michalski y Januel, 2006). Por otro lado, cuando se efectúa el tratamiento térmico previo a la



homogenización, las proteínas séricas se encuentran desnaturalizadas e interactúan con las proteínas nativas de la MFGM y con las caseínas micelares, particularmente con la  $\kappa$ -caseína, y luego, los complejos caseína-proteína sérica se adsorben sobre la interfase de los nuevos glóbulos grasos formados (van Boekel y Walstra, 1995). Sin embargo, los diferentes cambios composicionales en la membrana de los nuevos glóbulos formados según el orden en que se efectúe la homogenización y tratamiento térmico no influyen sobre el desnatado espontáneo (Michalski y Januel, 2006).

El principio de operación de un equipo de alta presión homogenización es similar al de un homogenizador convencional, con la diferencia de que puede trabajar a presiones más elevadas, por lo tanto, al igual que un homogenizador convencional provocará la reducción del tamaño del glóbulo graso lo cual es de especial interés en la industria láctea para evitar el desnatado y la coalescencia durante el almacenamiento del producto. Entre los factores que influyen en la distribución del tamaño del glóbulo graso se encuentran la presión aplicada, la temperatura de entrada, la aplicación de un segundo pase de homogenización y la utilización de una segunda válvula de homogenización convencional situada tras la válvula de homogenización de alta presión.

#### *Influencia de la presión aplicada*

En un trabajo realizado por Picart *et al.* (2006) la distribución de tamaño del glóbulo graso en leche cruda cambió notablemente tras la aplicación del tratamiento UHPH a presiones de 100 a 300 MPa y  $T_i = 24^\circ\text{C}$ , pasando de ser una distribución caracterizada por un único pico con un valor medio de  $3,81 \mu\text{m}$  a ser una distribución multimodal caracterizada por dos picos principales ( $0,63 \mu\text{m}$  y  $0,16 \mu\text{m}$ ). Al aumentar la presión a 300 MPa el pico de  $0,16 \mu\text{m}$  aumentó a expensas de una reducción en el pico de  $0,63 \mu\text{m}$ . En este estudio se observó una disminución del tamaño del glóbulo al incrementar la presión de trabajo, sin embargo, a diferencia de los estudios realizados por Thiebaud *et al.* (2003) y por Serra, Trujillo, Quevedo, Guamis y Ferragut (2007), no se describió la presencia de agregados a 300 MPa detectada por un incremento en el  $d_{4,3}$ , parámetro sensible a la presencia de pequeñas cantidades de grandes partículas. Dichos agregados también han sido encontrados en emulsiones de aceite en agua (Floury *et al.*, 2000) tratadas por UHPH a 300 MPa. Los autores de este estudio han sugerido que la formación de estos agregados puede deberse a que las proteínas del suero podrían estar

demasiado desnaturalizadas para estabilizar los nuevos glóbulos formados. Otra explicación para el incremento del tamaño del glóbulo graso tras el tratamiento a 250 MPa fue dada por Hayes *et al.* (2005) quienes sugirieron que la cantidad de caseína disponible para cubrir los nuevos glóbulos podría ser limitada por lo que se produciría una aglomeración parcial de estos pequeños glóbulos insuficientemente cubiertos.

#### *Influencia de la temperatura de entrada*

Es sabido que temperaturas menores a 30°C durante un tratamiento de homogenización son inefectivas en la reducción del glóbulo graso debido a que los lípidos se encuentran parcialmente en estado sólido. En estudios llevados a cabo por Thiebaud *et al.* (2003) y Picart *et al.* (2006) se ha observado que el incremento de la temperatura de entrada conduce a una mayor eficiencia en la reducción del glóbulo graso. A bajas temperaturas (5-7°C) no se detectaron diferencias entre muestras tratadas por homogenización convencional o tratadas a presiones de 50, 100 y 150 MPa, sin embargo, temperaturas superiores a 35°C mejoraron la disrupción de los glóbulos grasos debido a la disminución de la viscosidad en la fase dispersa (Thiebaud *et al.*, 2003).

#### *Influencia de un segundo pase de homogenización a alta presión*

Thiebaud *et al.* (2003) estudiaron el efecto de un segundo pase de homogenización a 200 MPa y  $T_i = 24^\circ\text{C}$ . Este segundo pase produjo una disminución del diámetro medio y permitió obtener una distribución de tamaño de los glóbulos más estrecha. Los datos revelaron que dos pases a 200 MPa fueron más efectivos que un pase a 300 MPa a la misma  $T_i$ . Además, el efecto de un segundo pase de homogenización fue mayor al efecto del incremento de la temperatura de entrada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este efecto sólo ha sido estudiado a 200 MPa y que estudios realizados por Floury *et al.* (2000) en emulsiones de aceite en agua han mostrado que al aumentar el número de pases a presiones de 20 a 150 MPa disminuye el tamaño del glóbulo graso, pero a presiones de 300 MPa parece ser que disminuye la eficiencia de la homogenización conduciendo a un incremento de la tasa de coalescencia.

#### *Influencia de una segunda válvula de homogenización convencional*

Trabajando a presiones de 100 a 200 MPa, una segunda válvula de homogenización convencional operando a un 10-20% de la presión de la primera

válvula, tal como se utiliza en un homogenizador convencional, limita la formación de agregados de glóbulos grasos (Hayes y Kelly, 2003b). Contrariamente, a presiones superiores a 200 MPa, la segunda válvula no muestra ninguna ventaja adicional. De hecho, a elevadas presiones se ha observado un incremento del tamaño medio del glóbulo graso y una mayor heterogeneidad en la distribución de tamaños (Serra *et al.*, 2007; Zamora, Ferragut, Jaramillo, Guamis y Trujillo, 2007).

### *Cambios químicos*

En presencia de oxígeno los lípidos de la leche sufren reacción de oxidación en la que los ácidos grasos insaturados reaccionan con el oxígeno molecular a través del mecanismo de radicales libres. Los productos primarios de la oxidación lipídica son los hidroperóxidos, quienes a elevadas temperaturas se pueden descomponer rápidamente en otros productos secundarios principalmente aldehídos y cetonas (van Boekel y Walstra, 1995).

La autooxidación de la grasa de la leche suele comenzar con los fosfolípidos de la membrana del glóbulo graso, lípidos que tienen un gran número de ácidos grasos insaturados (Walstra *et al.*, 2006c). Durante la aplicación de un tratamiento de pasteurización HTST o de alta pasteurización, parte del Cu (uno de los principales catalizadores de la reacción de oxidación) migra del plasma hacia la membrana del glóbulo graso donde se localizan los ácidos grasos insaturados susceptibles de ser oxidados (Walstra *et al.*, 2006c). Por otro lado, durante tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 70°C como la pasteurización, se producen diversos cambios en la membrana del glóbulo graso como: (1) la exposición de grupos sulfidrilos de las proteínas de la membrana con la subsiguiente formación de H<sub>2</sub>S, compuesto que actúa como antioxidante al reaccionar con el Cu que ha migrado desde la fase soluble hacia la MFGM formando CuS, (2) la incorporación de proteínas séricas, especialmente β-Lg y (3) la migración de fosfolípidos de la membrana hacia la fase acuosa (Lee y Sherbon, 2002; van Boekel y Walstra, 1995). Estos cambios limitan los fenómenos de oxidación en la leche.

Como se ha mencionado anteriormente, la UHPH reduce el tamaño del glóbulo graso y consecuentemente incrementa el área interfacial de la emulsión. Es sabido que el paso inicial en la oxidación lipídica de emulsiones se da en la interfase (McClements y Decker, 2000), por lo que debería esperarse que la tasa de oxidación lipídica se incrementara a medida que el tamaño del glóbulo graso disminuye. Es importante

señalar que estos cambios ocasionados en el glóbulo graso durante el tratamiento UHPH, junto con la temperatura alcanzada durante un tiempo tan breve, podrían incrementar la susceptibilidad de la grasa hacia la oxidación lipídica y hacia la lipólisis.

#### **2.4.4 Proteínas**

Las principales proteínas de la leche, las caseínas y las proteínas del suero, se presentan en dos fases: (1) la fase micelar, constituida por las micelas de caseína que difunden la luz y participan en el aspecto blanco opaco de la leche y (2) la fase soluble, constituida por diferentes polímeros proteicos hidrófilos, que constituyen las proteínas solubles o proteínas del lactosuero.

##### **2.4.4.1 Micelas de caseína**

La caseína es una proteína que precipita en condiciones ácidas a pH 4,6, es decir que es insoluble a su pH isoelectrico. De acuerdo a las estructuras primarias determinadas se pueden distinguir diversas caseínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$  -,  $\kappa$ - y  $\beta$ -caseína), las que a su vez pueden tener diferentes variantes (Creamer, 2004). Las caseínas son proteínas hidrofóbicas con alta carga necesaria para mantenerlas en solución, con una estructura de  $\alpha$ -hélices de corta longitud y de estructura terciaria muy sencilla.

Las diferentes caseínas se presentan en la leche en forma micelar, un complejo orgánico de las diferentes caseínas unidas a fosfato cálcico coloidal, que se encuentran en suspensión estable gracias a la presencia de cargas negativas y de grupos glucídicos hidrófilos (Walstra *et al.*, 2006c).

Hasta el día de hoy hay ciertas discrepancias entre autores sobre la estructura supramolecular de las micelas de caseína. Se han propuesto diversos modelos sobre la estructura de la micela los cuales se pueden clasificar como núcleo-corteza, estructura interna y modelos de subunidad. Waugh y Noble propusieron en el año 1965 el primer modelo núcleo-corteza, el primer modelo de subunidades fue propuesto por Morr en el año 1967, mientras que Rose en el año 1969 dio a conocer el primer modelo de estructura interna (Phadungath, 2005).

El modelo de las subunidades de Morr (1967) que proponía que las submicelas estaban unidas a través del fosfato cálcico coloidal dando a la micela una estructura porosa, ha sufrido a lo largo de los años diversos cambios (Ono y Obata, 1989; Schmidt, 1982; Walstra y Jenness, 1984a). El pensamiento actual basado en todas las observaciones disponibles del modelo de las subunidades se fundamenta en que las

submicelas tienen una composición variable y que las interacciones hidrófobas constituyen la fuerza predominante de unión de las caseínas individuales en la submicela, sin embargo, no son las únicas fuerzas presentes. Una distribución no uniforme de la  $\kappa$ -caseína en las submicelas permite que las submicelas interiores sean ricas en caseínas sensibles al Ca y que las submicelas ricas en  $\kappa$ -caseína se localicen en la superficie. Cuando el dominio polar de la  $\kappa$ -caseína, que no puede interactuar con el fosfato cálcico, ocupa una cantidad suficiente de la superficie micelar, ésta deja de crecer. A pesar de que el modelo extendido por Walstra y Jenness (1984a) ha sido ampliamente aceptado, recientemente Holt (1992) y Horne (1998) han propuesto dos modelos alternativos dentro de la clasificación de modelos de estructura interna (Phadungath, 2005; Qi, 2007).

El modelo de Holt (1992) describe que las moléculas de caseína forman una estructura tipo gel con nanoclusters de fosfato cálcico, donde el extremo C-terminal de la  $\kappa$ -caseína se extiende hacia el exterior de la superficie micelar contribuyendo a la capa pilosa. Dichos nanoclusters constituyen el centro de crecimiento de la micela. Unos años más tarde, Holt (1998) descubrió que la secuencia de aminoácidos fosforilados de la  $\beta$ -caseína podría unirse a los nanoclusters estabilizándolos y regulando su tamaño. Sin estas estructuras fosfopeptídicas los nanoclusters aumentarían de tamaño en exceso y precipitarían.

El modelo de doble unión propuesto por Horne (1998) podría considerarse como una extensión del modelo de Holt. La diferencia de este modelo es que considera que las interacciones proteína-proteína son esenciales y considera que la naturaleza anfifílica de las caseínas es la responsable de la polimerización y estructuración micelar. Según este modelo el crecimiento de la micela tiene lugar por un proceso de polimerización que involucra dos formas de unión: el entrecruzamiento a través de regiones hidrofóbicas de las caseínas y la repulsión electrostática que limita el crecimiento del polímero. La integridad micelar y la estabilidad se mantiene por un exceso de atracciones hidrofóbicas sobre las repulsiones electrostáticas funcionando cada caseína como un bloque de polímero.

#### *Efecto de los tratamientos térmicos sobre la micela de caseína*

Por lo general las temperaturas comprendidas entre 70 y 150°C pueden provocar en las micelas fenómenos de agregación y disociación (Singh, 1995). Las caseínas

tienen una estructura secundaria y terciaria muy sencilla, pero durante un tratamiento térmico se producen cambios en la forma en que se asocian dentro de la micela y con las proteínas del suero desnaturalizadas. Además, tratamientos térmicos severos pueden conducir a cambios en los residuos de amino ácidos de las caseínas como reacciones de desfosforilación, es decir, remoción del grupo fosfato de la fosfoserina, formación de lisinoalanina y la reacción de los grupos amino de la lisina con los grupos carbonilos de la lactosa dando lugar a las primeras etapas de la reacción de Maillard (Law, Horne, Banks, y Leaver, 1994).

#### *Efecto de la UHPH sobre la micela de caseína*

Hayes y Kelly (2003b) mostraron que una leche desnatada sometida a una homogenización convencional (18 MPa) y a tratamientos UHPH con un equipo Stansted (nm-GEN7400H) a presiones de 50 a 200 MPa no presentó cambio alguno en el tamaño de las micelas a presiones menores de 150 MPa y sólo observaron una disminución del 5% en las muestras homogenizadas a 200 MPa. Contrastando con los resultados previos, Roach y Harte (2008) utilizando también un equipo Stansted, pero trabajando con aislados de micelas de caseína, observaron una reducción del 30% en el tamaño de la micela incluso a presiones de 100 MPa. En estudios en los que se empleó leche desnatada en polvo reconstituída Sandra y Dalgleish (2005) utilizando un equipo Emulsiflex C-5 (Avestin) observaron una reducción significativa del tamaño de la micela de caseína al aumentar la presión de 41 MPa (209 nm) a 114 MPa (206 nm) y 186 MPa (199 nm) en comparación al control (214 nm). Dicha reducción se incrementó sobre todo a altas presiones (186 MPa) al aumentar el número de pases hasta un máximo de seis. Sandra y Dalgleish (2007) obtuvieron reducciones similares en leche desnatada tratada a 179 MPa en seis pases.

Los resultados obtenidos por Sandra y Dalgleish (2005; 2007) tanto en leche desnatada en polvo reconstituída como en leche desnatada a presiones inferiores de 200 MPa sugirieron que la alta presión homogenización no produce una completa disrupción de las micelas sino que más bien retira parte de la superficie micelar afectando especialmente a las  $\kappa$ - y  $\alpha_s$ -CN de la capa superficial micelar, solubilizándose estas caseínas debido a la disrupción de interacciones hidrofóbicas o a las fuerzas de cizalla que actúan sobre ellas.

#### **2.4.4.2 Proteínas del suero**

Las proteínas del suero, que representan aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche, son proteínas globulares con elevados niveles de estructura secundaria y terciaria y por lo tanto, susceptibles de ser desnaturalizadas. La  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) y la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) son las proteínas séricas mayoritarias en la leche representando aproximadamente un 20 y 50% del total de proteína sérica, respectivamente. En menor cantidad se encuentran en el suero lácteo la seroalbúmina bovina (BSA), inmunoglobulinas (Ig), lactoferrina, polipéptidos y ciertas enzimas.

La  $\beta$ -Lg es la principal proteína del suero de la leche y posee 4 principales variantes genéticas identificadas y designadas en la leche bovina como A, B, C y D. Su solubilidad depende fuertemente del pH y de la fuerza iónica, sin embargo no precipita al acidificar la leche (Fox, 2003).

La  $\alpha$ -La es una molécula muy compacta, siendo una proteína globular casi esférica. Su función biológica consiste en actuar como coenzima en la síntesis de la lactosa. Es una metaloproteína cálcica que cuando se une al calcio no es irreversiblemente termodesnaturalizada bajo la mayoría de las condiciones de procesamiento de la leche. Sin embargo, en ausencia de Ca, la  $\alpha$ -La se desnaturaliza a bajas temperaturas de manera irreversible (Walstra *et al.*, 2006c).

Las proteínas séricas son menos termoestables que la caseína, siendo las proteínas más termolábiles las Ig, seguidas por la  $\beta$ -Lg y la  $\alpha$ -La (Law *et al.*, 1994). Se conoce que en las condiciones de pasteurización de la leche (72°C, 15 s), aproximadamente un 7% de las proteínas del suero se desnaturalizan (Lawrence, 1991). En comparación, un tratamiento UHT puede provocar entre un 50-90% y 70-90% de desnaturalización, dependiendo de si el calentamiento es directo o indirecto, mientras que un tratamiento de esterilización en autoclave puede llegar a desnaturalizar la totalidad de las proteínas séricas (Andreini *et al.*, 1990). Las proteínas séricas desnaturalizadas se depositan sobre las micelas de caseína e interaccionan con éstas mediante un complejo que implica a la  $\kappa$ -CN y a la  $\beta$ -Lg (Jang y Swaisgood, 1990), aunque probablemente también pueden formarse complejos con la  $\alpha$ -La y la  $\alpha_{s2}$ -CN (Jelen y Rattray, 1995). Dichos complejos afectan la funcionalidad de las proteínas en cuanto a la estabilidad de la leche y a las propiedades de coagulación.

No se ha observado desnaturalización de las proteínas del suero en leches tratadas en un intervalo de presiones de 50 a 200 MPa (nm-GEN7400H, Stansted Fluid

Power Ltd.) y  $T_i = 6 - 10^\circ\text{C}$  (Hayes y Kelly, 2003b). Sin embargo, estudios llevados a cabo por otros investigadores ( $T_i = 30^\circ\text{C}$  o  $40^\circ\text{C}$ , válvula de alta presión similar al estudio previo) han descrito desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, la cual incrementó con el aumento de la presión, y una menor desnaturalización de  $\alpha$ -La (Hayes *et al.*, 2005; Zamora *et al.*, 2007). Esta diferencia entre autores se debe fundamentalmente a la máxima temperatura alcanzada durante el tratamiento UHPH, la cual en el primer caso no superó los  $55^\circ\text{C}$  mientras que en los otros estudios se alcanzaron temperaturas entre  $55$  y  $94^\circ\text{C}$ . Los resultados obtenidos por Hayes *et al.* (2005) al comparar la desnaturalización obtenida por UHPH y por un tratamiento térmico donde se alcanzan temperaturas similares, indican que la desnaturalización en muestras tratadas por UHPH fue mayor que la que se obtendría por el tratamiento térmico equivalente. Esto sugiere que la desnaturalización producida en el tratamiento UHPH puede deberse al efecto combinado de la temperatura alcanzada junto a las fuerzas que experimenta el fluido durante el tratamiento.

#### **2.4.5 Minerales**

Las sales minerales de la leche son principalmente fosfatos, citratos, cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. Dichas sales pueden estar tanto disueltas (en forma de moléculas o iones) o en estado coloidal. Algunas sales como los cloruros y las sales de Na y K son suficientemente solubles para estar presentes casi por completo en la fase continua, mientras que el Ca y Mg se encuentran mayoritariamente en forma de complejos. Las especies coloidales de las sales como el fosfato de calcio, existe por una parte en la forma soluble y por otro lado en una forma insoluble o coloidal asociada con las micelas de caseínas. Estas interacciones afectan a la estabilidad y funcionalidad de las proteínas de la leche, por lo que las sales desempeñan un papel importante en las propiedades de los productos lácteos.

Las sales de la leche se encuentran en equilibrio dinámico, equilibrio que hace referencia a la solubilidad y al estado de ionización de los minerales disueltos en ésta. El equilibrio mineral, principalmente de los cationes divalentes Ca y Mg y del fosfato se ve afectado por los cambios de composición que ocurren en la leche como consecuencia de los tratamientos tecnológicos (de la Fuente, 1998). De esta forma, pequeñas alteraciones en el equilibrio mineral pueden ocasionar importantes efectos en la estabilidad micelar.



Los tratamientos térmicos causan una disminución de la solubilidad del Ca y Mg y de los fosfatos solubles, que aumenta proporcionalmente con la intensidad del calentamiento (Pouliot, Boulet y Paquin, 1989).

Zamora *et al.* (2007) estudiaron el contenido de minerales (Ca, P y Mg) en el suero obtenido por centrifugación de geles enzimáticos producidos a partir de leche tratada por UHPH a presiones de 100 a 300 MPa con y sin efecto de una segunda válvula de homogenización convencional (30 MPa). Los autores observaron una disminución en los tres minerales en la fase soluble al incrementar la presión sugiriendo que la pérdida de minerales a 300 MPa pudo deberse a una transferencia mineral de la fase soluble a la coloidal debido al calentamiento sufrido durante el tratamiento UHPH. Por otro lado, la UHPH produce una disrupción parcial de las micelas de caseínas que puede llevar a una transferencia de Ca y de fosfato inorgánico de la micela a la fase soluble (Sandra y Dalgleish, 2005) lo cual podría explicar la mayor cantidad de Ca soluble detectada en 200 MPa en comparación con una leche pasteurizada.

#### **2.4.6 Lactosa**

El principal azúcar de la leche es la lactosa, disacárido formado por la unión de D-glucosa y D-galactosa. La lactosa presenta dos formas anoméricas,  $\beta$ -O-D-galactopiranosil-(1,4)- $\alpha$ -D-glucopiranososa ( $\alpha$ -lactosa) y  $\beta$ -O-D-galactopiranosil-(1,4)- $\beta$ -D-glucopiranososa ( $\beta$ -lactosa), siendo ambas anómeros formas reductoras que en la leche están en equilibrio debido al fenómeno de mutarrotación. La lactosa, cuyo poder edulcorante es alrededor de la quinta parte de la sacarosa, contribuye al sabor característico de la leche (Swaisgood, 2000).

Durante el tratamiento térmico de la leche la lactosa sufre una serie de reacciones que pueden conducir a cambios en el flavor, color, valor nutritivo y pH del producto. Las reacciones más importantes son la formación de lactulosa, la formación de ácidos y la reacción de Maillard.

La lactulosa se forma a través de la isomerización de la lactosa por la transformación Lobrey de Bruyn-Alberda van Ekenstein (O'Brien, 1995). La concentración de lactulosa ha sido propuesta por la International Dairy Federation (IDF) y la Unión Europea como un índice de la severidad del tratamiento térmico al cual ha sido sometida la leche ya que a las temperaturas utilizadas en un tratamiento HTST no se forma lactulosa. Sin embargo, durante un tratamiento UHT y de esterilización en

envase la concentración de lactulosa es elevada. Según lo establecido por el grupo de expertos de la Unión Europea, un contenido de lactulosa menor a 600 mg/L indica que se trata de una leche UHT mientras que en la leche esterilizada en envase dicho contenido será superior a 600 mg/L.

Al calentar por encima de los 100°C la lactosa se degrada a ácidos, principalmente ácido fórmico, con un considerable incremento de la acidez titulable. El ácido láctico representa sólo un 5% del ácido formado (Fox y McSweeney, 1998b).

La reacción de Maillard comienza con una reacción entre la lactosa y los grupos NH<sub>2</sub> libres, generalmente de residuos de lisina. A partir de una serie de reacciones se forma un compuesto más o menos estable que es la lactulosil-lisina a partir de la cual en una etapa intermedia se forman galactosa, hidroximetilfurfural (HMF) y residuos de lisina. El HMF tiene un fuerte flavor que altera el flavor típico de la leche mientras que, con los nuevos residuos de lisina se generan productos de polimerización (melanoidinas) que dan un color oscuro a la leche (O'Brien, 1997).

La lactulosil-lisina puede a su vez ser convertida en furosina la que, al igual que la lactulosa, es considerada un buen indicador del tratamiento térmico aplicado (Walstra *et al.*, 2006a).

En un tratamiento térmico intenso la reacción de Maillard juega un papel muy importante al generar cambios de flavor, pardeamiento del producto por la formación de melanoidinas y pérdida del valor nutritivo debido a la pérdida de lisina (Walstra *et al.*, 2006a).

A pesar de que hasta el momento no se ha estudiado la degradación de la lactosa en leche tratada por UHPH, el tratamiento térmico es muy limitado en esta tecnología, por lo que cabe esperar que tanto la formación de lactulosa como de los productos de la reacción de Maillard no sean importantes.

#### **2.4.7 Cambios en el flavor**

La aceptación de la leche por parte del consumidor viene dada en primer lugar por su flavor. El tratamiento térmico tiene un efecto muy importante sobre el flavor de la leche pudiendo afectar de manera positiva o negativa según la intensidad del tratamiento aplicado. Un tratamiento de pasteurización baja (72°C y 15 s) no sólo no produce la formación de aromas y sabores indeseables sino que además reduce las bacterias del deterioro y enzimas que podrían afectar negativamente el flavor de la leche (Nursten, 1995). Los leches de alta pasteurización (p.e. 85°C y 20 s) se caracterizan por

un distintivo flavor a cocido y un ligero flavor “UHT/cetona” y a veces, dependiendo de la intensidad del tratamiento, trazas de flavor a “caramelo” (Boelrijk, de Jong y Smit, 2003). Una leche UHT se identifica por un flavor cocido, causado principalmente por la presencia de H<sub>2</sub>S liberado tras la desnaturalización proteica, junto con un flavor “caramelo” y un flavor típico asociado con la formación de cetonas. Usualmente, los defectos de flavor de la leche UHT suelen disminuir durante los días siguientes al procesado a causa de la oxidación de los compuestos azufrados. Durante un tratamiento de esterilización en botella se desarrolla un fuerte flavor a cocido, cetona y a caramelo, este último causado por la formación de ciertos productos de la reacción de Maillard y productos de caramelización, los cuales pueden incluso enmascarar el flavor a cocido (Walstra, Wouters y Geurts, 2006d).

Hasta el momento no se han realizado estudios de los compuestos volátiles formados en leches UHPH. Podría esperarse que en tratamientos en los que la LPL no sea completamente inactivada, como se ha sugerido en el trabajo efectuado por Hayes y Kelly (2003b) en el que se trató leche en un intervalo de presiones de 50 a 200 MPa y  $T_i = 5-7^\circ\text{C}$ , que la presencia de esta enzima junto con el aumento del área interfacial debido a la reducción del glóbulo graso, condujeran a la lipólisis o a la oxidación lipídica. Ambas son las principales reacciones involucradas en la producción de sabores extraños. El defecto de flavor asociado con la oxidación lipídica se describe como metálico o acartonado (Marsili, 2004), mientras que la producción de ácidos grasos libres de cadena corta y media generados en la lipólisis pueden generar la aparición de sabores rancios (Duncan y Christen 1991).

#### **2.4.8 Vitaminas**

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos: (1) las vitaminas hidrosolubles (vitaminas del grupo B y vitamina C) que se encuentran en la fase acuosa y (2) las vitaminas liposolubles (vitamina A, D y E) que están asociadas a la materia grasa.

La leche es una buena fuente de vitaminas, especialmente de vitamina A y de la mayoría de las vitaminas del grupo B. En lo que respecta a las vitaminas C, D y E su contenido no es muy importante, sin embargo, dichas vitaminas pueden ser adquiridas a través de otros elementos de la dieta (Walstra *et al.*, 2006c).

En general, durante el tratamiento de pasteurización no se producen cambios substanciales en la calidad nutritiva de la leche, aunque durante un tratamiento UHT puede haber pérdidas considerables de folacina, ácido ascórbico, vitamina B<sub>12</sub> y tiamina

(Anderson y Öste, 1995). En general, la pasteurización y la esterilización UHT causan mucha menos pérdida de vitaminas de la que ocurre durante la preparación casera de alimentos.

Hasta el momento no se han llevado a cabo estudios de vitaminas en leche tratada por UHPH, pero cabe esperar que tenga poco efecto por la limitación de la temperatura en estos tratamientos.

## **2.5 Efectos de la ultra alta presión homogenización sobre las propiedades de la leche**

### **2.5.1 Apariencia y pH**

Los efectos descritos de la UHPH sobre el balance mineral de la leche pueden afectar su pH. Hayes y Kelly (2003b) trabajando en un equipo Stansted (nm-GEN7400H) con leche entera en un intervalo de presiones de 50 a 250 MPa y con una  $T_i = 5-7^\circ\text{C}$  sugirieron que el pH también puede ser afectado debido a la inactivación parcial de la LPL endógena de la leche durante el tratamiento UHPH. En este trabajo los autores observaron que el pH de la leche almacenada a  $4^\circ\text{C}$  postpresurización disminuyó a medida que se incrementó la presión según el siguiente orden 200 MPa = 150 MPa > 100 MPa > 50 MPa. A mayor presión la reducción del tamaño del glóbulo graso es mayor por lo que la enzima tiene mayor área de superficie interfacial en la grasa donde puede actuar. En otro estudio, Hayes *et al.* (2005) utilizando el mismo equipo antes mencionado pero con una mayor temperatura de entrada ( $T_i = 45^\circ\text{C}$ ), reportaron una disminución del pH a 150 MPa, pero no a 200 o 250 MPa debido a que al utilizar una temperatura de entrada de la leche más alta que en el trabajo previo, las temperaturas alcanzadas al pasar por la válvula también fueron superiores, logrando de esta manera la inactivación de la LPL.

En diversos trabajos realizados por Hayes *et al.* (2005; 2003b) se ha observado que al igual que los tratamientos de homogenización convencional los tratamientos UHPH de 100, 150 y 200 MPa pueden modificar la claridad de la leche (aumentar el valor  $L^*$ ) en comparación con una muestra control sin homogenizar debido a la reducción del tamaño del glóbulo graso. Por otro lado, en leche desnatada se ha observado que muestras tratadas a 300 MPa presentan menor valor  $L^*$  que a 100 y 200 MPa, hecho que se ha asociado a la reagregación que puede producirse entre las micelas tras el tratamiento (Serra, Trujillo, Jaramillo, Guamis y Ferragut, 2008a).

## 2.5.2 Propiedades de coagulación de la leche

### 2.5.2.1 Coagulación enzimática

Varios grupos de investigadores han estudiado el efecto de la UHPH sobre los parámetros relacionados con las propiedades de coagulación enzimática de la leche como el tiempo de floculación (RCT) y las propiedades del gel. En general, en muestras tratadas por UHPH en un intervalo de presiones de 50 a 200 MPa (etapa simple o doble) con  $T_i = 5-7^\circ\text{C}$ , el tiempo de formación del gel disminuye, mientras que la velocidad de formación y la firmeza del gel aumentan en comparación con muestras no tratadas (Hayes y Kelly, 2003b). Más recientemente, Zamora *et al.* (2007) han mostrado que el tratamiento de UHPH de simple etapa a 200 y 300 MPa ( $T_i = 30$  y  $40^\circ\text{C}$ ) mejora las propiedades de coagulación enzimática de la leche entera. No obstante, dichas propiedades fueron afectadas negativamente con la utilización de la segunda etapa (30 MPa) la cual produjo geles más débiles, similares a los obtenidos con un tratamiento de homogenización-pasteurización convencional. La mejora de las propiedades de coagulación de la leche mediante la utilización de la UHPH puede deberse a un efecto combinado de la presión, que produce la reducción del tamaño de partícula, junto con el incremento de temperatura, que produce la desnaturalización de las proteínas del suero y por lo tanto la formación de nuevas estructuras lipo-proteicas en la leche que aumentan el número de enlaces potenciales para crear el gel.

Estudios de coagulación enzimática realizados en nuestros laboratorios sobre leche de cabra a presiones de 100 a 300 MPa (simple y doble etapa) con  $T_i = 30$  y  $40^\circ\text{C}$  han mostrado, a diferencia del trabajo efectuado por Zamora *et al.* (2007) en leche de vaca, que los tratamientos de UHPH a 100 y 200 MPa mejoran de forma considerable la firmeza del gel, mientras que el tratamiento de 300 MPa produce geles de estructura muy débil en comparación a la leche cruda. En todos los tratamientos efectuados la aplicación de la segunda etapa disminuyó la firmeza del gel. Al comparar con tratamientos convencionales de pasteurización con y sin homogenización, la aplicación de tratamientos UHPH hasta 200 MPa mejora las propiedades de coagulación de la leche de cabra disminuyendo el tiempo de coagulación enzimática, aumentando la velocidad de agregación y la firmeza del gel formado (Joan Miquel Quevedo, comunicación personal).

### **2.5.2.2 Coagulación ácida**

En el caso de la coagulación ácida, a diferencia de la enzimática, la información disponible es muy limitada. Recientemente, Serra *et al.* (2007) han llevado a cabo estudios de coagulación ácida en yogur utilizando un equipo Stansted (FPG 11300, Stansted Fluid Power Ltd.) a presiones de 100 - 300 MPa con y sin doble etapa (30 MPa) y temperaturas de entrada de 30 y 40°C. Los yogures preparados a 200 y 300 MPa, a ambas Ti, presentaron mayor fuerza del gel durante la coagulación, mayor firmeza del gel en el análisis de textura y menor sinéresis que los yogures preparados con leche tratada térmicamente (90°C y 90 s), homogenizada a 15 MPa y suplementada con 3% de leche en polvo desnatada. La doble etapa no mejoró las propiedades de coagulación llegando a producir en ciertos casos peores características que la etapa simple equivalente. Serra *et al.* (2008a) utilizando las mismas condiciones de presión y temperatura que en el trabajo previo llevaron a cabo otro estudio de coagulación ácida pero en leche desnatada. Los resultados mostraron que al aumentar la presión la densidad del gel y la tasa de agregación aumentaron, sin embargo, los valores de firmeza del gel disminuyeron siendo los geles de 100 MPa los más firmes. Según los autores la desintegración de las micelas de caseína causada por la UHPH a elevadas presiones junto a la menor sinéresis podrían conducir a la formación de redes más débiles. Recientemente, Hernández y Harte (2008) estudiaron el efecto de la UHPH (0-350 MPa), sola o en combinación con un tratamiento térmico (90°C, 5 min), en la elaboración de geles ácidos a partir de leche desnatada. En este trabajo, los datos han mostrado que el efecto combinado de ambos tratamientos originó la disociación de las micelas de caseína y la desnaturalización de las proteínas del suero mejorando de esta manera las propiedades físicas y viscoelásticas de los geles. A partir de estos resultados los autores sugieren que la combinación de ambos tratamientos (UHPH y térmico) podría ser utilizada para mejorar la textura y estabilidad de los yogures evitando de esta manera la utilización de estabilizantes y aditivos.

### **2.5.3 Características del queso elaborado a partir de leche UHPH**

Hasta el momento la literatura existente sobre la utilización de la UHPH para la producción de quesos es muy limitada. Guerzoni, Vannini, Chaves Lopez, Lanciotti, Suzzi y Gianotti (1999) evaluaron el efecto de la aplicación de 100 MPa (Panda, Niro Soavi) sobre la leche destinada a la producción de queso de cabra. La aplicación de la alta presión homogenización en la leche generó un incremento de las bacterias ácido

lácticas en el queso producido a partir de esta leche en comparación con un queso de leche pasteurizada además de un incremento de la actividad proteolítica y lipolítica la cual, según los autores, pudo deberse a un efecto indirecto generado por el cambio en la población microbiana o a diferentes formas de exposición de las macromoléculas frente a las enzimas. Kheadr *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la UHPH sobre la calidad microbiológica, reológica y microestructural de queso Cheddar. Los quesos fueron elaborados con leche entera tratada por UHPH, leche desnatada tratada por UHPH y estandarizada con nata pasteurizada, leche entera pasteurizada (72°C y 15 s) y leche estandarizada al 2% en grasa y tratada por UHPH. Los tratamientos UHPH se efectuaron a 200 MPa,  $T_i = 28^\circ\text{C}$  y 5 pases (Emulsiflex-c160, Avestin Inc). La exposición de la leche a la UHPH de manera previa a la elaboración del queso resultó en un incremento de la retención de la humedad y proteína, y consecuentemente del rendimiento quesero en comparación con quesos elaborados a partir de leche pasteurizada. Además, los quesos elaborados a partir de leche tratada por UHPH mostraron una textura más firme, elástica y cohesiva debido a la formación de una matriz de caseína muy compacta y regular en la cual se detectó la presencia de glóbulos grasos de pequeño tamaño. Lanciotti *et al.* (2004; 2006) utilizando el mismo equipo y condiciones descritas por Guerzoni *et al.* (1999) compararon quesos Crecenza y Caciotta obtenidos mediante leche tratada térmicamente y quesos de leche tratada por UHPH, estos últimos mostrando la presencia de elevadas cantidades de ácidos grasos libres así como una mayor proteólisis y modificaciones en el perfil de volátiles. Estos autores, coincidiendo con Guerzoni *et al.* (1999), indicaron que los diferentes patrones de proteólisis y lipólisis obtenidos entre quesos podrían deberse a un efecto indirecto del cambio de población microbiana generada por el tratamiento de alta presión. Por otro lado y según el estudio realizado por Lanciotti, Patrignani, Iucci, Saracino, y Guerzoni (2007b) sobre el efecto de la aplicación de la alta presión homogenización (50 -150 MPa) en diferentes cepas de *Lactobacillus* spp., la mayor proteólisis también podría atribuirse a la liberación de proteasas de la pared celular o proteasas intracelulares del microorganismo debido al efecto de la presión. Este incremento de los procesos proteolíticos en queso causados por la alta presión homogenización, si bien pueden ser positivamente aprovechados en la disminución del tiempo de maduración del queso, pueden causar la formación de compuestos no deseados como las aminas biógenas. En este contexto, Lanciotti *et al.* (2007a) evaluaron la cantidad de aminas biógenas durante el madurado del queso de leche de vaca y de oveja obtenido a partir de leche tratada por

alta presión homogenización a 100 MPa. Los datos obtenidos por los autores sostienen que los cambios cuali- y cuantitativos generados en la microbiota de los quesos junto a las modificaciones inducidas por el tratamiento de alta presión homogenización en las macromoléculas causaron una drástica reducción en la acumulación de aminas biógenas hacia el final de la maduración del queso.

Recientemente se han llevado a cabo estudios en nuestros laboratorios con el objetivo de comparar las tecnologías de pasteurización y UHPH como tratamientos aplicados a la leche de cabra previa a la obtención de queso. En dicho estudio se observó que los rendimientos brutos potenciales queseros estuvieron fuertemente influenciados por los procesos utilizados siendo el incremento de rendimiento potencial respecto a la leche cruda de 24, 31 y 65% para las leches tratadas por pasteurización (72°C y 15 s), homogenización-pasteurización (18 + 2 MPa, 72°C y 15 s) y UHPH (200 MPa Ti = 30°C), respectivamente. El mayor rendimiento obtenido en el caso de la leche tratada por UHPH se debe a que además de la desnaturalización de las proteínas séricas producida por el incremento térmico, se produce una alteración más profunda sobre estas proteínas debido a las fuerzas de impacto, cizalla y cavitación, que llevan a producir modificaciones en la capacidad de retención de agua de los geles. Los estudios de microestructura mostraron que los glóbulos grasos de los quesos obtenidos mediante leche tratada por UHPH se integraron completamente dentro de la matriz proteica dando una estructura más compacta mientras que los ensayos de textura indicaron que dichos quesos fueron más firmes durante la maduración (Quevedo, Buffa, Guamis y Trujillo, 2008). Sobre estos mismos quesos también se evaluó la calidad microbiológica durante la maduración. Los recuentos de enterobacterias y lactococos disminuyeron rápidamente durante la maduración en todos los quesos siendo los quesos UHPH los que mostraron los menores recuentos de estos grupos microbianos. Por otra parte, los quesos UHPH presentaron los mayores recuentos de lactobacilos, enterococos y micrococcos (Joan Miquel Quevedo, Comunicación personal). Estas diferencias en la microbiota de los quesos a lo largo de la maduración podrían afectar las características sensoriales ya que por ejemplo, los lactobacilos pueden contribuir al proceso de maduración mediante la producción de ácido láctico y por sus actividades proteolítica y lipolítica.



#### 2.5.4 Características del yogur elaborado a partir de leche UHPH

Al igual que en el caso del queso, existe poca información sobre el efecto de la UHPH para la producción de yogurt. Lanciotti, Vannini, Pittia y Guerzoni (2004) fueron los primeros investigadores en publicar un trabajo sobre el efecto de la alta presión homogenización en la producción de yogurt, sin embargo, en su estudio fueron utilizadas presiones inferiores a 100 MPa. En ese trabajo, los autores evaluaron las características microbiológicas y reológicas de yogures elaborados con diferente contenido de grasa y sólidos de leche. Todos los yogures se caracterizaron por presentar recuentos del cultivo utilizado como fermento superiores a 8 ufc/mL al finalizar la fermentación y superiores a 7 ufc/mL tras 60 días de almacenamiento a 4°C. En otro estudio llevado a cabo por este mismo grupo de investigadores (Patrignani *et al.*, 2007) se evaluó el efecto de la alta presión homogenización (a presiones < 100 MPa) sobre la velocidad de fermentación de la cepa probiótica *Lactobacillus paracasei* BFE 5264 inoculada en leche y sobre los parámetros de textura, propiedades reológicas y formación de compuestos volátiles de los coágulos obtenidos. Los datos mostraron que los tiempos de coagulación fueron significativamente afectados por la presión y el contenido en grasa de la leche mientras que las propiedades reológicas de la leche fermentada como firmeza, viscosidad y consistencia aumentaron al incrementar la presión en el caso de leche con menos de 3% de sólidos no grasos. Estos autores concluyeron que la aplicación de esta tecnología podría ser una herramienta útil en la producción de yogures con probióticos.

En cuanto a la aplicación de presiones superiores a 100 MPa, estudios realizados en nuestros laboratorios evaluaron las características de yogures firmes y yogures batidos producidos con leche tratada por UHPH durante el almacenamiento en refrigeración por 28 días utilizando como control el yogurt fortificado con 3% de leche en polvo desnatada (Serra, Trujillo, Guamis y Ferragut, 2009). Los resultados dieron a conocer que los yogures obtenidos a partir de leche tratada por UHPH presentaron mayor capacidad de retención de agua y mayor firmeza que el yogurt convencional, sin embargo, en el caso de los yogures batidos, a pesar de que algunos parámetros como la consistencia y la sinéresis fueron mejores que los de un yogurt tradicional, estos yogures mostraron una textura granulosa, textura con características negativas para el consumidor. En estudios posteriores Serra *et al.* (2008b, 2008c) evaluaron el grado de lipólisis, proteólisis y de oxidación de yogures preparados con leche tratada a 200 y 300 MPa con  $T_i = 30$  y 40°C y los compararon con yogures preparados con leche tratada

térmicamente (90°C y 90 s), homogenizada a 15 MPa y suplementada con 3% de leche en polvo desnatada. Tanto el nivel de lipólisis como el de oxidación fueron similares en todos los yogures, excepto en el yogur obtenido a partir del tratamiento UHPH a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  en el que los valores de ácidos grasos libres fueron elevados desde el primer día de almacenamiento, hecho que según los autores se atribuye a la actividad residual de la LPL. Los datos de proteólisis mostraron que los yogures elaborados a partir de leche tratada a 300 MPa presentaron niveles de caseína residual y un perfil de péptidos solubles similar al obtenido en el caso de yogures elaborados con leche tratada térmicamente. Por el contrario, los yogures elaborados con leche tratada a 200 MPa con ambas  $T_i$  mostraron mayor cantidad de péptidos hidrofóbicos sobre todo al final del almacenamiento lo cual podría producir un sabor amargo indeseado.

En un último estudio llevado a cabo por Serra, Trujillo, Guamis y Ferragut (2008d) se evaluó el perfil de ácidos orgánicos y compuestos volátiles en los yogures elaborados en las condiciones mencionadas en los estudios previos. A partir de este trabajo, dado que los yogures tratados a 300 MPa presentaron un perfil de volátiles muy similar al de los yogures convencionales, además de presentar un menor contenido de ácido láctico, los autores sugirieron que el tratamiento de 300 MPa podría ser una alternativa al tratamiento térmico convencional para obtener yogures de adecuada calidad sin la necesidad de tener que adicionar sólidos no-grasos.

Finalmente, en la Tabla 5 se detallan de manera resumida las principales características relacionadas con la calidad de la leche destinada al consumo de leche fluida que se han estudiado hasta el momento en leche entera tratada por UHPH utilizando equipos de la marca Stansted.

**Tabla 5:** Principales efectos producidos por la UHPH en leche entera a diferentes presiones y temperaturas utilizando equipos de la marca Stansted.

Item	Presión (MPa)	Ti (°C)	T2 (°C)	Tiempo de retención (s)	Efecto por UHPH	Modelo	Referencia
Reducción de la microbiota nativa de la leche	100 - 300	4 14 24	30 - 64 36 - 71 41 - 78	< 0,5	A mayor Ti y mayor presión aumentó la inactivación de la microbiota endógena. La utilización de un segundo pase generó una activación adicional igual a la alcanzada con el primer paso. Las bacterias Gram-negativas presentaron menor resistencia a la UHPH que las Gram-positivas.	FPG 7400H Flujo: 16 l/h	Thiebaud <i>et al.</i> (2003)
	50 - 200	5 - 7	26 - 51	20	El recuento de la microbiota total disminuyó significativamente a presiones de 150 y 200 MPa. La utilización de un segundo pase tuvo un mayor efecto sobre la destrucción microbiana.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2003a)
	150 - 250	45	67 - 83	20	Psicrótrofos reducidos en 2,73 log a 150 MPa y completamente eliminados a 200 y 250 MPa. Mesófilos reducidos en 1,3 1,83 y 3,06 log a 150, 200 y 250 MPa. No se detectaron coliformes en ninguno de los tratamientos.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2005)
	100 - 300	4 24	30 - 63 40 - 76	< 0,5	La reducción de la microbiota endógena aumentó con el incremento de la presión: 2 a 3 log a 250 y 300 MPa, respectivamente. No hubo diferencias en la utilización de un segundo pase a una menor presión (10% de la primera)	FPG 7400H Flujo: 16 l/h	Picart <i>et al.</i> (2006)
	200 - 250 + 5 MPa	55 70		20	El recuento de la microbiota total disminuyó en ~ 5 log. Psicrótrofos, coliformes y lactobacilos estuvieron debajo del límite de detección inmediatamente tras el tratamiento UHPH. Incremento de la microbiota estudiada durante el almacenamiento a 4 °C por 14 días	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Smiddy <i>et al.</i> (2007)

**Tabla 5:** (Continuación )

Item	Presión (MPa)	Ti (°C)	T2 (°C)	Tiempo de retención (s)	Efecto por UHPH	Modelo	Referencia
Enzimas	50 - 200	5 - 7	26 - 51	20	<p>La inactivación de la plasmina y plasminógeno aumentó al incrementarse la presión.</p> <p>La segunda etapa generó mayor reducción comparada con la etapa simple.</p> <p>La inactivación puede deberse al ligero incremento de temperatura combinado con las fuerzas generadas en el tratamiento.</p> <p>La fosfatasa alcalina no pudo ser completamente eliminada en ninguna condición estudiada.</p>	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2003b)
	150 - 250	45	67- 83	20	<p>La actividad de la plasmina, fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa fue reducida por el tratamiento UHPH, incrementándose la inactivación con el aumento de presión.</p> <p>La inactivación de la plasmina osciló entre 85 y 95%, mientras que la de la lactoperoxidasa entre 8 y 100% y la de la fosfatasa alcalina entre 71 y 100 %.</p>	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2005)
	200	10 - 50	56 - 80	20	<p>La inactivación total de la fosfatasa alcalina se produjo a 75°C (Ti ~ 40 - 45°C ) debido únicamente al efecto térmico.</p> <p>La inactivación total de la lactoperoxidasa se produjo a 80°C (Ti ~ 50°C ) principalmente debido a las fuerzas experimentadas por el fluido en su paso a través de la válvula.</p> <p>La inactivación total de la LPLse produjo a 71°C (Ti ~ 35°C ). La UHPH generó una activación de la enzima a temperaturas por debajo de los 57°C.</p> <p>La inactivación de la plasmina fue debida a las fuerzas generadas en la válvula de alta presión más que al efecto del incremento de la temperatura.</p>	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Datta <i>et al.</i> (2005)
	100 - 300	4 24	30 - 63 40 - 76	< 0,5	<p>Temperaturas &lt; 58°C producen ligera activación de la ALP.</p> <p>La enzima fue completamente inactivada a presiones superiores a 200 MPa (Ti =24°C) o por encima de 250 MPa (Ti = 4°C).</p> <p>La inactivación fue principalmente debida a las fuerzas en la válvula de alta presión.</p>	FPG 7400H Flujo: 16 l/h	Picart <i>et al.</i> (2006)

**Tabla 5:** (Continuación)

Item	Presión (MPa)	Ti (°C)	T2 (°C)	Tiempo de retención (s)	Efecto por UHPH	Modelo	Referencia
Reducción del tamaño del glóbulo graso	100 - 300	4 14 24	30 - 64 36 - 71 41 - 78	< 0,5	Presiones de 200 a 250 MPa produjeron una reducción significativa del tamaño del glóbulo graso. A 300 MPa se observó la formación de agregados.	FPG 7400H Flujo: 16 l/h	Thiebaud <i>et al.</i> (2003)
	50 - 200	5 - 7	26 - 51	20	El tamaño del glóbulo graso disminuyó al aumentar la presión. La utilización de una segunda etapa a presiones superiores a 100 MPa ayudó a evitar la recoalescencia.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2003a)
	150 - 250	45	67 - 83	20	A 250 MPa se observó un ligero incremento del tamaño del glóbulo respecto a los tratamientos a 150 y 200 MPa.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2005)
	100 - 330	30 40	50 - 90 58 - 98	< 0,7	Reducción del tamaño del glóbulo se observó de 100 a 200 MPa, mientras que a 300 MPa se observó la formación de grandes partículas o agregados. No se detectaron diferencias en la reducción de tamaño a igual presión entre 30 y 40°C.	FPG 11300 Flujo: 120 l/h	Serra <i>et al.</i> (2007)
	100 - 330	30	54 - 94	< 0,7	El incremento de la presión de 100 a 300 MPa generó una reducción del tamaño del glóbulo, sin embargo a 330 MPa se observó la formación de grandes partículas o agregados. La utilización de la segunda etapa produjo un incremento del tamaño de partícula comparado al tratamiento de simple etapa equivalente.	FPG 11300 Flujo: 120 l/h	Zamora <i>et al.</i> (2007)
	100 - 300	4 24	30 - 63 40 - 76	< 0,5	No se observó la formación de agregados a presiones superiores a 200 MPa.	FPG 7400H Flujo: 16 l/h	Picart <i>et al.</i> (2006)

**Tabla 5:** (Continuación )

Item	Presión (MPa)	Ti (°C)	T2 (°C)	Tiempo de retención (s)	Efecto por UHPH	Modelo	Referencia
Desnaturalización de las proteínas del suero	50 - 200	5 - 7	26 - 51	20	No observó desnaturalización de las proteínas del suero en las condiciones de presión y temperatura estudiadas.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2003a)
	150 - 250	45	67 - 83	20	La desnaturalización de la $\beta$ -Lg fue mayor (10 - 56 %) que la de la $\alpha$ -La (< 10%) e incrementó con el aumento de la presión.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2005)
	100 - 330	30	54 - 94	< 0,7	La desnaturalización de la $\beta$ -Lg fue mayor (20 - 35 %) que la de la $\alpha$ -La (12%) entre 200 y 300 MPa. A 100 MPa el tratamiento UHPH generó una muy pequeña reducción (< 10%) de ambas proteínas séricas.	FPG 11300 Flujo: 120 l/h	Zamora <i>et al.</i> (2007)
	200	10 - 50	56 - 80	20	A temperaturas superiores a 65°C (Ti = 30°C) la desnaturalización de la $\beta$ -Lg aumentó de manera lineal con el incremento de la temperatura. La inactivación de esta proteína puede deberse al efecto sinérgico de la temperatura y las fuerzas generadas en la válvula de alta presión.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Datta <i>et al.</i> (2005)
Propiedades físicas y químicas	50 - 200	5 - 7	26 - 51	20	El pH disminuyó al aumentar la presión posiblemente debido a la reducción del glóbulo graso combinado con la inactivación parcial de la LPL. La UHPH al igual que la homogenización convencional aumentó la luminosidad de la leche.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2003a)
	150 - 250	45	67 - 83	20	La UHPH al igual que la homogenización convencional aumentó la luminosidad de la leche. No se observó desnatado espontáneo en la leche tratada por UHPH.	nm-Gen 7400H Flujo: 18 l/h	Hayes <i>et al.</i> (2005)



# **SECCIÓN III**

---

**Publicaciones relacionadas con la tesis**





---

### 3. Publicaciones relacionadas con la tesis

- 1) **Effect of Ultra High-Pressure Homogenization on natural-occurring microorganisms in bovine milk.** Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. *Milchwissenschaft*, vol 61 (3), pp. 245-248. (2006)
- 2) **Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physico-chemical Shelf-Life of Milk.** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A. *Journal of Dairy Science*, vol 90, pp. 1081-1093. (2007).
- 3) **Characterization of volatile compounds in ultra-high pressure homogenized milk.** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A. *International Dairy Journal*, vol 18, pp. 826-834. (2008).
- 4) **Proteolysis of ultra-high pressure homogenized treated milk during refrigerated storage.** Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., Trujillo, A. *Food Chemistry*, vol 111, pp. 696-702. (2008).
- 5) **Effects of ultra-high pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage.** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 7125-7130, (2008).
- 6) **Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk.** Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A. *Food Hydrocolloids*, En revisión. (Anexo I)



## *Artículo 1*

### **3.1 EFFECT OF ULTRA HIGH-PRESSURE HOMOGENIZATION ON NATURAL-OCCURRING MICRO-ORGANISMS IN BOVINE MILK.**

Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A.  
*Milchwissenschaft*, vol 61 (3), pp. 245-248. (2006)



# Effect of ultra high-pressure homogenisation on natural-occurring micro-organisms in bovine milk

By Julieta PEREDA, V. FERRAGUT, B. GUAMIS, A. J. TRUJILLO

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), CeRTA, XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Spain)

E-Mail: Toni.Trujillo@uab.es

---

This study aimed to evaluate the effect of ultra high-pressure homogenisation (UHPH) on natural-occurring micro-organisms in bovine milk. Whole raw milk was standardised at 3.5% and was processed using a Stansted High Pressure Homogeniser (model FPG11300, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). The microbiological quality of raw, high pasteurized (90°C, 15 s) and pressure treated (200 and 300 MPa at inlet temperatures of 30 and 40°C) milks was studied by enumerating total bacteria, psychrotrophic bacteria, coliforms, lactococci, lactobacilli and enterococci. UHPH treatments were as efficient (99.99%) as high-pasteurization treatment in reducing the total bacterial population, reaching important reductions (3-4 log cfu/ml). Lactococci count behaviour was similar to that of total bacteria count, reaching the same reductions. Psychrotrophic bacteria counts were not detected in high-pasteurized milks and were reduced by 3-4 logs and on some occasions up to undetected levels in UHPH-treated milks. Coliforms, lactobacilli and enterococci were completely destroyed by both UHPH and heat treatments.

## **Wirkung der Ultrahochdruck-Homogenisierung auf natürlich vorkommende Mikroorganismen in Kuhmilch**

Ziel dieser Studie war es Aufschlüsse über die Wirkung der Ultrahochdruck-Homogenisierung (UHDH) auf natürlich vorkommende Mikroorganismen in Kuhmilch zu erhalten. Die Rohmilch wurde auf 3,5% standardisiert und mit einem Stansted Hochdruck-Homogenisierer (Model FPG1 1300, Stansted Fluid Power Ltd, Essex, UK) weiterverarbeitet. Die mikrobiologische Qualität von Rohmilch, hochechitzter (90°C 15 s) und druckbehandelter Milch (200 und 300 MPa bei Einlasstemperaturen von 30 und 40°C) wurde durch Zählen aller Bakterien - psychrotrophe Bakterien, Coliforme, Laktokokken, Laktobazillen und Enterokokken - untersucht. Bezüglich der Reduzierung der gesamten Bakterienpopulation war die UHDH-Behandlung genauso effektiv (99,99%) wie die Behandlung durch



hohe Pasteurisierung, wobei die Zahlen wesentlich verringert werden konnten (3-4 Log kbE/ml). Die Laktobazillen verhielten sich ähnlich wie alle übrigen Bakterien und verringerten sich in gleichem Maße. Die Anzahl der psychrotrophen Bakterien wurden bei der hoch pasteurisierter Milch nicht ermittelt, bei der UHDMilch reduzierte sie sich um 3-4 Log und fiel teilweise auf nicht bestimmbar Level ab. Coliforme, Laktobazillen und Enterokokken wurden sowohl durch die UHPH Behandlung als auch durch die Hitzebehandlung zerstört.

## 21 Ultra-high pressure homogenisation (inactivation of bacteria in milk)

## 21 Ultrahochdruck-Homogenisierung (Inaktivierung von Bakterien in Milch)

### 1. Introduction

Milk is a nutritious medium that presents a favourable environment for the multiplication of microorganisms and can contain a wide range of spoilage and pathogenic bacteria. Microbial growth can degrade milk components, creating negative sensory attributes and decreasing processed milk shelf-life. To avoid this, different microbial inactivation processes have been used. Heat treatment is the oldest and most widely used technological process applied to milk, with pasteurization treatment being the thermal process usually applied to liquid milk. Milk can be heated rapidly to 72°C for 15 s (high temperature short-time pasteurization) or heated to 80-90°C for 15 s (high pasteurization) with the purpose of reducing spoilage bacteria and eliminating any potential pathogenic microorganism that could be present in milk.

In recent years, there has been a lot of research to replace traditional food preservation technologies such as heat treatment with emerging techniques due to the increased consumer demand for tasty, nutritious and natural products. Ultra high-pressure homogenization (UHPH) is one of the food preservation treatments that is being developed and applied as a minimal process for the production of a wide variety of safe and nutritious foods. UHPH is commonly used for cell disruption of dense microbial cultures (1-3, 7) and it can also be used to cause a reduction of the microbial population, extending the shelf life and improving the microbial safety of food products (4-6, 8-10). In this study, the effects of UHPH treatment on naturally-occurring microorganisms of raw bovine milk at pressures  $\geq 200$  MPa, which until now have not received much attention, were examined. The effects of heat (90°C, 15 s) and UHPH treatments were compared.

### 2. Materials and methods

#### 2.1 Milk supply

Fresh raw bovine milk was collected on a local farm (Can Badó, Barcelona, Spain) for several days within a six-week period. On some occasions deficient handling of raw milk was intentionally carried out in order to obtain high microbial counts. Milk was standardised at the Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) at the Universitat Autònoma de Barcelona at 3.5% and stored for 24 h at 4°C.

#### 2.2 Ultra high-pressure homogenisation (UHPH) and pasteurization of milk

Homogenization of raw milk was performed with a Stansted high pressure homogeniser (model FPG 11300, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). This device comprises a high pressure ceramic valve able to support 350 MPa and a second pneumatic valve able to

support up to 50 MPa located after the first one. The high pressure system consists of two intensifiers, driven by a hydraulic pump. The flow rate of milk in the homogeniser was approximately 120 l/h. To minimise temperature retention after treatment, two spiral type heat-exchangers (Garvía, Barcelona, Spain) located behind the second valve were used.

Two-stage homogenization (18 MPa plus 2 MPa) of raw milk was performed with a NIRO SOAVI homogenizer (model X68P Matr. 2123, 43100 Parma, Italy) and pasteurization of raw milk was performed with a FINA-MAT heat exchanger (model 6500/010, GEA FINNAH GmbH, D-4422 Ahaus, Germany).

Milk was heated and UHPH-treated under the following conditions:

- pasteurized (PA) milk at 90°C for 15 s (high pasteurization, negative test for peroxidase)
- UHPH-treated milk at 200 and 300 MPa with inlet temperatures of 30 and 40°C for both pressures.

#### 2.3 Microbiological analysis

The microbiological quality of the different milks, including raw milk, was assessed by enumerating the following microorganisms:

- Total bacteria on PCA medium (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) incubated for 48 h at 30°C.
- Psychrotrophic bacteria on PCA medium (Oxoid) incubated for 72 h at 21°C
- Coliform on VRBL medium (Oxoid) incubated for 24 h at 37°C
- Lactobacilli on Rogosa agar medium (Oxoid) incubated for 72 h at 30°C
- Lactococci on M17 agar medium (Oxoid) incubated for 48 h at 30°C
- Enterococci on kanamycin aesculin azide agar medium (Oxoid) incubated for 48 h at 37 °C

*Listeria(L.:) monocytogenes* was detected in a two-stage enrichment procedure. Twenty-five ml of milk were pre-enriched in Half Fraser Broth (bioMérieux S.A.) and incubated at 37°C for 24 h; 1 ml of the pre-enriched sample was incubated in Fraser Broth (bioMérieux S.A.) at 37°C for 24 h. Enrichment was then streaked onto Palcam agar medium (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 h.

*Salmonella* sp. was detected in a two-stage enrichment procedure. Twenty-five milliliter of milk were pre-enriched in buffered peptone water (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 h; 1 ml of the pre-enriched sample was incubated in Muller Kauffman Broth (bioMérieux S.A.) and 0.1 ml in Rappaport Vassiliadis Broth (bioMérieux S.A.) at 37 or 42°C for 24 h, respectively. Enrichments were streaked onto XLD (Oxoid) and SMID2 agar media (bioMérieux S.A.) and incubated at 37°C for 24 h.



**Table 1: Total counts (PCA medium; cfu/ml)**

Milks	Raw	Raw stored 4°C, 24 h	Pasteurized 90°C, 15 s	200 MPa		300 MPa	
				30°C	40°C	30°C	40°C
A	46000			24	12	15	9
B	233500			26	38	35	28
C		177500		48	20	20	18
D		124500		16	14	10	6
E	91500	298000	Nd	16	9	16	11
F	201000	196000	Nd	28	2	2	3
G	90000	8920000	23	111	77	59	59
H	12720	25000	15	23	19	23	58

Nd = Not detected

**Table 2: Psychrotrophs counts (PCA medium 20°C; cfu/ml)**

Milk	Raw stored 4°C, 24 h	Pasteurized 90°C, 15 s	200 MPa		300 MPa	
			30°C	40°C	30°C	40°C
D	128000		1	1	Nd	Nd
E	420000	Nd	5	6	2	8
F	193000	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

**Table 3: Lactococci counts (M17 medium; cfu/ml)**

Milk	Raw stored 4°C, 24 h	Pasteur-ized 90°C/15 s	200 MPa		300 MPa	
			30°C	40°C	30°C	40°C
D	71500		16	19	13	11
E	216000	Nd	9	9	8	7
F	74500	Nd	3	2	3	2
G	3230000	44	86	70	74	60
H	49000	24	26	19	25	15

### 3. Results and discussion

The bacterial population found in the different milks is shown in Tables 1-3. Total counts of refrigerated raw milks varied from  $2.5 \times 10^4$  to  $\sim 9 \times 10^6$  cfu/ml. This high variation in the total counts, including low, medium and extremely high counts, allowed us to study the efficiency of the UHPH treatments applied, compared to heat treatment. Overall, UHPH treatments were as efficient (99.99%) in reducing the bacterial population as was high pasteurization treatment, reaching important reductions (3-4 log cfu/ml). This reduction was higher than that obtained by HAYES *et al.* (8) of 1.83 log cfu/ml working at 200 MPa (Stansted 'nm-GEN' 7400H). In another study HAYES *et al.* (12) also working with the Stansted 'nm-GEN' 7400H reached a reduction of 75% of total bacterial count at 200 MPa. THIEBAUD *et al.* (10) also obtained lower microbial reductions (1-1.15 log cfu/ml) working at 200 MPa and at inlet temperature of 24°C (Stansted HP homogenizer model FPG7400 H). KEHADR *et al.* (4) obtained 2 log cycles inactivation for total counts in whole bovine milk (3.4% fat) after homogenization at 200 MPa (5 passes) with an inlet temperature of 28°C. Differences observed in total counts between this study and other works could be explained by differences in the valve construction and machine design.

Some authors (8, 10) found that reduction in total counts was pressure dependent, with lower counts as homogenization pressure increased. However, in this study, when we compared treatments carried out at 200 and 300 MPa at the same inlet temperature we could observe that in almost all the productions, samples treated at 300 MPa showed slightly lower counts than those treated at 200 MPa, nevertheless differences were not significant.

Possible mechanisms of UHPH responsible for destruction of bacteria include sudden pressure drops, torsion and shear stresses, cavitation shock waves, turbulence, viscous shear and high velocity collisions (2,5,9,12), although the temperature increase produced in the UHPH valve (up to  $\sim 100^\circ\text{C}$  for  $\sim 0.5$  s in this study), especially in treatments at 300 MPa with inlet temperature of  $40^\circ\text{C}$ , may also play an important role in microbial inactivation.

Psychrotrophic bacteria counts were not detected in high pasteurized milks and were reduced by 3-4 logs and on some occasions up to undetected levels in UHPH milks. These results agree with those of HAYES *et al.* (8). THIEBAUD *et al.* (10) obtained 1.3-1.6 log cycle reductions for this microbial group at 200 MPa (inlet T of  $24^\circ\text{C}$ ) and 2.7-3.1 log cycle reductions at 300 MPa, while GUERZONI *et al.* (6) obtained 2 log cycles inactivation for psychrotrophs in goat milk after homogenization at 100 MPa (inlet T and homogeniser type not indicated).

Coliform counts are widely used as a contamination index. An elevated number in milk indicates deficient handling during milking, collection or manipulation. Coliforms are destroyed by pasteurization; hence, any coliforms found in treated milk indicate post treatment contamination. In the present study, coliform counts in raw milk varied from  $2.9 \times 10^3$  to  $2.3 \times 10^5$  cfu/ml, which indicated very low bacteriological quality of milk. Nevertheless, coliforms were reduced by heat and UHPH treatments up to undetectable levels regardless of the initial microbial level and in the case of UHPH treatment regardless of pressure and inlet temperatures applied. Similar results were obtained by GUERZONI *et al.* (6) and HAYES *et al.* (8) in goat and cow milks, respectively.



Enterococci counts in raw milk ranged between  $1.48 \times 10^3$  and  $1.04 \times 10^5$  cfu/ml, but this microorganism group was not detected in either high pasteurized or UHPH milks. In spite of the fact that enterococci are highly resistant to freezing, drying and heat treatments such as conventional pasteurization, it could be observed that UHPH treatments were very active against this microbial group. However, different results published by WUYTACK *et al.* (9) have shown that enterococci were one of the most resistant microorganisms to UHPH. GUERZONI *et al.* (6) reported a reduction from 4.06 to 0.92 log units in raw goat milk treated at 100 MPa.

Reductions in lactococci bacteria counts were similar to those obtained in total bacteria counts (3-4 log units). The efficiency of the treatments was approximately 99.99%. SABOYA *et al.* (3), working on cell suspensions, reported that in order to break 80% of lactococci cells, one pass at 200 MPa was required. Lactococci inactivation showed the same slight dependence on pressure as in the case of total bacteria counts.

Lactobacilli counts ranged from 2.25 to 3.9 log units in raw milk. However, lactobacilli were absent in heat and UHPH milks. These results agree with those of SABOYA *et al.* (3) who found that one pass at only 50 MPa could destroy 80% of lactobacilli cells, but do not agree with those of THIEBAUD *et al.* (10) who obtained inactivation ratios of 1.0-1.6 and 1.2-2.3 at 200 and 300 MPa respectively (one pass), with a milk inlet temperature of 24°C.

SABOYA *et al.* (3) working at pressures from 50 to 200 MPa (Standsted Fluid Power, Stansted, UK) showed that microorganism shape is an important factor determining bacterial resistance to UHPH, since lactobacilli were much more fragile toward treatments than lactococci. Nevertheless, the results of WUYTACK *et al.* (9) contradict this postulate. In their study coccus were much more sensitive than rods to UHPH. In the present study, results obtained are not related to cell shape. Lactobacilli were very sensitive to heat and UHPH treatments, but in relation to coccus, lactococci showed resistance while enterococci did not.

No *Salmonella* spp. or *L. monocytogenes* were detected in any raw milk sample using the protocols described above. Due to this, we can make no conclusion about the efficacy of UHPH treatments on the destruction of these pathogenic micro-organisms. However, in the literature there are some studies about the destruction of foodborne pathogens. In our laboratories, BRIÑEZ *et al.* (13) inoculated 2 different strains of *Esche-richia coli* (*E. coli* ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857) in milk. Working at an inlet temperature of 20 °C and pressure treatment of 300 MPa at the primary homogenising valve and 30 MPa at the secondary valve (model/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd.) reached lethality values of 4.30 and 3.94 log units, for each strain respectively. In another study BRIÑEZ *et al.* (14), working with the conditions previously mentioned, obtained a reduction of 4.31 log cycles in inoculated *L. innocua*, whereas KHEADR *et al.* (4) reached a reduction of 3 to 4 log cycles after homogenisation at 200 MPa for 5 passes at an inlet temperature of 28°C. Results presented by VACHON *et al.* (11) showed that three and five passes at 200 MPa were required to achieve complete elimination of *Salmonella enteritidis*

and *E. coli* O157:H7, while 5 passes at 200 MPa resulted in a 5 cycle log reduction of *L. monocytogenes*.

#### 4. Conclusions

Results obtained in the microbiological analysis of bovine milks showed that UHPH technology (200 and 300 MPa at inlet temperatures of 30 ad 40°C) was as efficient as high pasteurization treatment (90°C, 15 s) in reducing the bacterial populations studied. Coliforms, lactobacilli and enterococci were very sensitive to UHPH and to high-pasteurization treatments. In all cases counts were reduced up to undetectable levels regardless of the initial microbial count. Psychrotrophs were not detected in high pasteurized milks and were reduced by 3-4 logs and on some occasions up to undetected levels in UHPH milks.

Our results suggest that UHPH could be used to obtain milk with a microbiological quality similar to pasteurized milk. This means that it could be possible to obtain commercial pasteurized milk by UHPH treatment. However, in order to confirm this, further studies must be carried out, in the first place to evaluate microbial counts and sensory characteristics during shelf life, and secondly to study nutritional characteristics of UHPH milk compared to pasteurized milk.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the European Union for the financial support given to this investigation (CRAFT project 512626), and Julieta Pereda acknowledges a pre-doctoral fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR).

#### 5. References

- (1) SIDDIQI, S.F., TITCHENER-HOOKER, N.J., SHAMLLOU, P.A.: *Biotechnol. Bioeng.* **55** (4) 642-649 (1997)
- (2) MIDDELBERG, A.: *Biotechnol. Advances* **13** (3) 491-551 (1995)
- (3) SABOYA, L., MAILLARD, M.B., LORTAL, S.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30** 1-5 (2003)
- (4) KHEADR, E.E., VACHON, J.F., PAQUIN, P., FLISS, I.: *Int. Dairy J.* **12** 435-446 (2002)
- (5) POPPER, L., KNORR, D.: *Food Technol.* **44** 84-89 (1990)
- (6) GUERZONI, M.E., VANNINI, L., CHAVEZ-LOPEZ, C., LANCIOTTI, R., SUZZI, G., GIANOTTI, A.: *J. Dairy Sci.* **82** 851-862 (1999)
- (7) BURY, D., JELEN, P., KALÁB, M.: *Innov. Food Sci. & Emerging Technol.* **2** 23-29 (2001)
- (8) HAYES, M.G., FOX, P.F., KELLY, A.L.: *J. Dairy Res.* **72** 25-33 (2005)
- (9) WUYTACK, E.Y., DIELS, A.M.J., MICHIELS, C.W.: *Int. J. Food Microbiol.* **77** 205-212 (2002)
- (10) THIEBAUD, M., DUMAY, E., PICART, L., GUIRAUD, J.P., CHEFTEL, J.C.: *Int. Dairy J.* **13** 427-439 (2003)
- (11) VACHON, J.F., KHEADR, E.E., GIASSON, J., PAQUIN, P., FLISS, I.: *J. Food Prot.* **65** (2) 345-352 (2002)
- (12) HAYES, M.G., KELLY, A.L.: *J. Dairy Res.* **70** 297-305 (2003).
- (13) BRIÑEZ, W.J., ROIG-SAGUÉS, A.X., HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M., GUAMIS-LÓPEZ, B.: *Le Lait*. In press
- (14) BRIÑEZ, W.J., ROIG-SAGUÉS, A.X., HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M., GUAMIS-LÓPEZ, B.: *J. Food Prot.* **69** (1) 86-92 (2006).

## *Artículo 2*

### **3.2 EFFECTS OF ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION ON MICROBIAL AND PHYSICOCHEMICAL SHELF LIFE OF MILK.**

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.  
*Journal of Dairy Science*, vol 90, pp. 1081-1093. (2007)





## Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk

J. Pereda, V. Ferragut, J. M. Quevedo, B. Guamis, and A. J. Trujillo<sup>1</sup>

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), CeRTA, XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

### ABSTRACT

The effect of ultra-high pressure homogenization (UHPH) on microbial and physicochemical shelf life of milk during storage at 4°C was studied and compared with a conventional heat preservation technology used in industry. Milk was standardized at 3.5% fat and was processed using a Stansted high-pressure homogenizer. High-pressure treatments applied were 100, 200, and 300 MPa (single stage) with a milk inlet temperature of 40°C, and 200 and 300 MPa (single stage) with a milk inlet temperature of 30°C. The UHPH-treated milks were compared with high-pasteurized milk (PA; 90°C for 15 s). The microbiological quality was studied by enumerating total counts, psychrotropic bacteria, lactococci, lactobacilli, enterococci, coliforms, spores, and *Pseudomonas*. Physicochemical parameters assessed in milks were viscosity, color, pH, acidity, rate of creaming, particle size, and residual peroxidase and phosphatase activities. Immediately after treatment, UHPH was as efficient (99.99%) in reducing psychrotrophic, lactococci, and total bacteria as was the PA treatment, reaching reductions of 3.5 log cfu/mL. Coliforms, lactobacilli, and enterococci were eliminated. Microbial results of treated milks during storage at 4°C showed that UHPH treatment produced milk with a microbial shelf life between 14 and 18 d, similar to that achieved for PA milk. The UHPH treatments reduced the L\* value of treated milks and induced a reduction in viscosity values of milks treated at 200 MPa compared with PA milks; however, these differences would not be appreciated by consumers. In spite of the fat aggregates detected in milks treated at 300 MPa, no creaming was observed in any UHPH-treated milk. Hence, alternative methods such as UHPH may give new opportunities to develop fluid milk with an equivalent shelf life to that of PA milk in terms of microbial and physicochemical characteristics.

**Key words:** ultra-high pressure homogenization, milk shelf life, microbial inactivation, physicochemical characteristic

### INTRODUCTION

Milk is a nutritious medium that presents a favorable environment for the growth of spoilage and pathogenic microorganisms. Therefore, milk as a raw material has a short shelf life and needs to be processed. Milk produced industrially for commercial usage usually undergoes several processes including standardization of fat content according to the type of milk required, homogenization, and pasteurization. With conventional homogenization, milk is passed through 2 homogenization valves (2-stage homogenization) under moderate pressures (~18 to 20 MPa). This technology helps to prevent creaming during storage due to the reduction of fat globule size. Pasteurization is a thermal process usually applied to liquid milk in which milk can be heated rapidly to 72°C for 15 to 20 s (high-temperature short-time pasteurization) or heated to 80 to 90°C for 15 s (high-pasteurization). The main purpose of this treatment is to eliminate any potential pathogenic microorganisms that could be present and to reduce spoilage bacteria, which can create negative sensory attributes decreasing processed milk shelf life. However, thermal processes besides destroying microorganisms can cause changes in nutritional, organoleptic, or technological properties of milk (Andersson and Oste, 1995; Nursten, 1995; Singh, 1995).

Food preservation is a continuous fight against microorganisms spoiling the food or making it unsafe. In recent years, the food industry has investigated the replacement of traditional food preservation technologies such as heat treatment by new preservation techniques due to the increased consumer demand for tasty, nutritious, and natural products (Hayes and Kelly, 2003b). High-pressure processing is one of the food preservation treatments being developed and applied as a minimal process for the production of safe and nutritious foods (Kheadr et al., 2002; Hayes and Kelly, 2003a; Briñez et al., 2006a). One class of high-pressure technology based on homogenization is mi-

Received July 25, 2006.

Accepted October 23, 2006.

<sup>1</sup>Corresponding author: Toni.Trujillo@uab.es

crofluidization, which is based on the principle of collisions between high-speed liquid jets. The fluid is divided into 2 channels at the valve inlet, which then collide in the reaction chamber. Another type of high-pressure processing that has been developed is high-pressure homogenization (**HPH**). The principle of the operation is similar to that of conventional homogenizers used in the dairy industry except that it works at higher pressures (up to 400 MPa). This technology is also called ultra-high pressure homogenization (**UHPH**) depending on the pressure achieved. However, the pressure limit between HPH and UHPH has never been established. In this article, we will refer to UHPH for pressures above 100 MPa. Ultra-high pressure homogenization technology was first used in the pharmaceutical, chemical, and biochemical industries (Popper and Knorr, 1990; Flourey et al., 2000). Several applications of UHPH for the food industry have been reported. Possible uses of this technology for the dairy industry include reduction of fat globule size, inactivation of enzymes, and destruction of bacteria. The fat globule size reduction of emulsions lowers the creaming rate and consequently improves shelf life (Thiebaud et al., 2003). The effect of UHPH on native milk enzymes (lactoperoxidase, plasmin, and alkaline phosphatase) has been studied by Hayes and Kelly (2003b) and Hayes et al. (2005), who showed that greater inactivation is achieved by increasing pressure. Related to microbiology, HPH and UHPH have been commonly used for cell disruption of dense microbial cultures (Saboya et al., 2003), and to cause a reduction of the microbial population, improving the microbial safety of food products (Kheadr et al., 2002; Thiebaud et al., 2003; Hayes et al., 2005). In general, by increasing the pressure, inlet temperature, and number of passes through the machine, more microbial inactivation is achieved. Different authors (Vachon et al., 2002; Hayes et al., 2005; Pereda et al., 2006) have suggested the possible potential of UHPH as a combined pasteurization and homogenization step to obtain commercial milk with a shelf life similar to conventional market milk. However, literature related to the effects of UHPH on milk shelf life is scarce. To date, physicochemical and microbiological changes of UHPH-treated milks at different temperatures and pressures have been studied immediately after treatment but not during storage (Thiebaud et al., 2003; Hayes et al., 2005; Pereda et al., 2006). Only a recent work of Smiddy et al. (2007) in which microbial shelf life of milk was assessed is available. In that study, a microbial shelf life between 4 and 7 d was obtained for UHPH-treated milk at 200 or 250 MPa at the first valve and 5 MPa at the second valve.

The aim of this work was to study different UHPH conditions (pressure and inlet temperature combinations) to compare the effects of heat (90°C, 15 s) and UHPH treatments on the microbial and physicochemical shelf life of whole bovine milk during storage at 4°C.

## MATERIALS AND METHODS

### *Milk Supply*

Fresh raw bovine milk ( $11.6 \pm 1.0\%$  TS and  $3.29 \pm 0.03\%$  protein) was collected from a local farm (Can Badó, Barcelona, Spain) and was standardized at  $3.5 \pm 0.2\%$  of fat, stored for 24 h at 4°C, and processed at the Center Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) at the Universitat Autònoma de Barcelona.

### *UHPH and Heat Pasteurization of Milk*

Ultra-high pressure homogenization of raw milk was performed with a Stansted high-pressure homogenizer (model FPG11300, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). This device comprises a high-pressure ceramic valve able to support 350 MPa and a second pneumatic valve, located after the first one, able to support up to 50 MPa. The high-pressure system consisted of 2 intensifiers driven by a hydraulic pump. The flow rate of milk in the homogenizer was approximately 120 L/h. To minimize temperature retention after treatment, 2 spiral-type heat-exchangers (Garvía, Barcelona, Spain) located behind the second valve were used. The inlet temperature (**T<sub>i</sub>**), the temperature before reaching the first homogenization valve (**T<sub>1</sub>**), the temperature before the second homogenization valve (**T<sub>2</sub>**), as well as the final temperature of the milk after passing through the heat exchanger (**T<sub>F</sub>**), were monitored throughout the experiment. Milk was UHPH-treated under the following conditions: 100, 200, and 300 MPa (single-stage) with inlet temperature of 40°C, and at 200 and 300 MPa (single-stage) with **T<sub>i</sub>** = 30°C.

To obtain high-pasteurized milk (**PA**), raw milk was subjected to a 2-stage homogenization (18 MPa plus 2 MPa), using a Niro Soavi homogenizer (model X68P, Niro, Parma, Italy) and subsequently heat pasteurized using a Finamat heat exchanger (model 6500/010, Gea Finnah GmbH, Ahaus, Germany) at 90°C for 15 s.

Before treatments, equipment was disinfected by circulating a diluted disinfectant (20%) including peracetic acid and hydrogen peroxide (P3-Oxonia Active, Ecolab Hispanic Portuguese, Barcelona, Spain) in water (80%) for 15 min at 30°C. Milk samples were collected in sterile containers and stored at 4°C. Microbial

and physicochemical analyses of treated samples were conducted after treatment (d 0) and at 7, 14, 18, and 21 d of storage. Three replications were performed.

### Microbiological Analysis

The microbiological quality of treated and untreated milk was assessed by enumerating the following microorganisms. Total bacteria were enumerated on plate count agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK), pour-plated, and incubated for 48 h at 30°C. Psychrotrophic bacteria were enumerated on plate count agar (Oxoid), pour-plated, and incubated for 72 h at 21°C. Coliforms were enumerated on violet red bile agar medium (Oxoid), pour-plated, and incubated for 24 h at 37°C. Lactobacilli and lactococci were enumerated on Rogosa and M17 agar (Oxoid), respectively, pour-plated, and incubated for 72 h and 48 h, respectively, at 30°C. Enterococci were enumerated on kanamycin esculin azide agar (Oxoid), pour-plated, and incubated for 48 h at 37°C. *Pseudomonas* spp. were enumerated on pseudomonas agar base supplemented with cetrimide fucidin (Oxoid), spread-plated, and incubated for 96 h at 20°C. Milk samples were heated at 80°C for 5 min, quickly cooled in ice, and pour-plated on plate count agar for enumeration of total spores; plates were incubated for 48 h at 30°C. The presence of *Listeria monocytogenes* was detected using a 2-stage enrichment procedure. Twenty-five milliliters of milk was preenriched in half-Fraser broth (bioMérieux S.A., Marcy L'Etoile, France) and incubated at 37°C for 24 h. One milliliter of the preenriched sample was then incubated in Fraser broth (bioMérieux S.A.) at 37°C for 24 h. The enriched sample was then streaked onto Palcam agar medium (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 h. The presence of *Salmonella* spp. was detected using a 2-stage enrichment procedure. Twenty-five milliliters of milk was preenriched in buffered peptone water (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 h. One milliliter of the preenriched sample was then incubated in Muller-Kauffman broth (bioMérieux S.A.) and 0.1 mL in Rappaport-Vassiliadis broth (bioMérieux S.A.) at 37°C and 42°C for 24 h, respectively. Enrichments were then streaked onto XLD (Oxoid) and SMID2 media (bioMérieux S.A.) and incubated at 37°C for 24 h.

The detection limit was 1 cfu/mL of milk for all microorganisms except for *Pseudomonas*, which was 10 cfu/mL of milk.

### Particle Size Determination

The particle size distribution in milk samples was determined using a Beckman Coulter Laser Diffraction

particle size analyzer (LS 13 320 series, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Milk samples were diluted in distilled water to reach appropriated laser obscuration. An optical model based on the Mie theory of light scattering by spherical particles was applied by using the following conditions: real refractive index = 1.471; refractive index of fluid (water) = 1.332; imaginary refractive index = 0; pump speed = 21%. The size distribution was characterized by the diameter below which 50 or 90% of the volume of particles are found (**D50** and **D90**, respectively), the Sauter diameter (surface-weighted mean diameter, **D<sub>3,2</sub>**), and the volume-weighted mean diameter (**D<sub>4,3</sub>**) value. Each sample was measured in triplicate.

### Compositional Analysis of Milk

Fat content of milk was measured using the Gerber method (IDF, 1981) and TS and total N contents were analyzed in triplicate by the IDF (1987, 2002) standards, respectively. The pH of milk samples was monitored during storage using a micropH 2001 pH meter (Crison, Alella, Spain) and total acidity was determined by titration with 0.1 N NaOH.

Lactoperoxidase (**LP**; EC 1.11.1.7) activity was determined spectrophotometrically at 413 nm (CECIL 9000, CECIL Instruments, Cambridge, UK) and 20°C using 1 mM ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma Aldrich Co., St Louis, MO) in phosphate buffer (0.1 M at pH 6) and 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, according to the method described by Shindler et al. (1976). Alkaline phosphatase (**ALP**; EC 3.1.3.1) activity was determined spectrophotometrically at 400 nm using *p*-nitrophenyl disodiumphosphate (15.8 mM in 0.9 M 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer at pH 10.45) and 37°C as described by Chávarri et al. (1998).

Enzyme units were expressed in units/mL, where one unit (U) is defined as the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 micromole of product per minute. All enzyme determinations were done in triplicate.

### Color Determination

Color values of milk samples were determined using a Hunter Lab colorimeter (MiniScan XETM, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA). Color coordinates were measured with an illuminant of D65 and a standard observer of 10° and the colorimeter was calibrated against white and black tile standards. Fifty milliliters of each milk sample was warmed to 20°C before analysis. The Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) L\*, a\*, and b\* values were measured in triplicate. The L\* value represents the



lightness with values from 0 (black) to 100 (white), which indicates a perfect reflecting diffuser; the  $a^*$  and  $b^*$  axes have no specific numerical limits and represent chromatic components. Positive values of  $a^*$  are red and negative values are green, whereas positive values of  $b^*$  are yellow and negative ones are blue.

### Viscosity Determination

Viscosity of milk samples was measured in duplicate at 20°C with a rotational rheometer (Haake Rheo Stress 1, Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) using an internal cylinder Z34 (DIN53019) and an external cylinder Z34 (DIN53018). Samples were subjected to an increasing shear rate from 0 to 140 s<sup>-1</sup> in 3 min and the experimental flow curves were fitted to the Newton model,  $\tau = \eta\dot{\gamma}$ , where  $\tau$  is the shear stress (Pa),  $\eta$  is the viscosity (Pa × s), and  $\dot{\gamma}$  is the shear rate (s<sup>-1</sup>).

### Rate of Creaming

Immediately after UHPH or heat treatment, milk samples (100 mL) were placed in graduated cylinder tubes (100 ± 0.30 mL), which were sealed and stored in a cool room at 4°C. The volume of the cream separated from the milk was measured at 0, 4, 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 h and expressed as milliliters of cream per 100 mL of milk.

### Statistical Analysis

Results were analyzed by an ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2004). Data were presented as least squares means. The Tukey test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significant level of  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Temperature Increase During UHPH Treatment

The milk temperatures measured for the conditions used in this study are shown in Table 1. A linear temperature increase of 19.15°C per 100 MPa in the pressure range from 100 to 300 MPa at  $T_i = 40^\circ\text{C}$  was calculated by plotting  $T_2$  vs. pressure. This linear rise of the temperature with the homogenization pressure is in agreement with the values obtained by Thiebaut et al. (2003) of 18.5°C per 100 MPa working from 100 to 300 MPa with inlet temperatures of 4, 14, and 24°C. Increases of 16.6°C per 100 MPa at 150 to 250 MPa and  $T_i = 45^\circ\text{C}$ , and 17.6°C per 100 MPa in the pressure range of 50 to 200 MPa at  $T_i$  from 6 to 10°C, were observed by Hayes et al. (2005) and Hayes and Kelly

**Table 1.** Temperature changes<sup>1</sup> of milk during ultra-high pressure homogenization treatment<sup>2</sup>

$T_i$ (°C)	Homogenization pressure (MPa)	$T_1$ (°C)	$T_2$ (°C)
40	100	43.0 ± 1.0	64.7 ± 1.5
	200	46.7 ± 0.6	84.0 ± 1.0
	300	50.0 ± 1.0	103.0 ± 1.0
30	200	39.0 ± 0.0	78.7 ± 1.2
	300	42.7 ± 0.6	97.3 ± 0.6

<sup>1</sup> $T_i$  = inlet temperature;  $T_1$  = temperature before the first homogenization valve;  $T_2$  = temperature before the second homogenization valve.

<sup>2</sup>All temperature values are means (± standard deviations) of data from 3 independent experiments.

(2003a), respectively. The increase of temperature during UHPH treatments is a consequence of the adiabatic heating generated in the machine in addition to the high turbulence, shear, and cavitation forces that the fluid suffers in the homogenization valve (Hayes and Kelly, 2003a; Thiebaut et al., 2003).

After reaching  $T_2$ , milk was quickly cooled by passing through a heat exchanger, therefore the holding time at the higher temperature  $T_2$  was very short ( $\leq 0.7$  s). This reduction of heating time during the UHPH treatment in comparison with heating time during pasteurization is very important to obtain products with less thermal damage, thus avoiding adverse effects on milk flavor and nutrients.

### Microbial Inactivation

Microbial populations found in raw, PA-, and UHPH-treated milks immediately after treatments and during storage are shown in Table 2.

In this study, psychrotrophic counts of raw refrigerated milks ranged between  $5.3 \times 10^4$  to  $9.5 \times 10^4$  cfu/mL. Significant decreases in psychrotrophic counts at d 0 were observed for milk samples treated at 200 and 300 MPa at both inlet temperatures and for PA milk. Results showed that UHPH treatments were as efficient (99.99%) in reducing the psychrotrophic bacterial population as PA treatment, reaching reductions of approximately 3.5 log cfu/mL. Nevertheless, treatment at 100 MPa at 40°C was not able to reduce microbial counts to significant levels in comparison with raw milk, and the reduction achieved was close to the limit established by the European normative ( $n = 5$ ,  $c = 1$ ,  $m = 5 \times 10^4$ ,  $M = 5 \times 10^5$ ) for pasteurized milks where  $n$  = number of sample units comprising the sample;  $m$  = threshold value for the number of bacteria, and the result is considered satisfactory if the number of bacteria in all sample units does not exceed “ $m$ ”;  $M$  = maximum value for the number of bacteria, and the result is considered unsatisfactory if the number

**Table 2.** Microbial populations (log cfu/mL) of raw and treated milks during storage at 4°C<sup>1</sup>

Microbial group	Day	Treatment						
		Raw	Pasteurized: 90°C for 15 s	200 MPa at 30°C	300 MPa at 30°C	100 MPa at 40°C	200 MPa at 40°C	300 MPa at 40°C
Psychrotrophs	0	4.9 <sup>a</sup> ± 0.1	1.4 <sup>b</sup> ± 0.2	1.5 <sup>b</sup> ± 0.6	1.6 <sup>b</sup> ± 0.2	4.2 <sup>a</sup> ± 0.5	1.5 <sup>b</sup> ± 0.6	1.2 <sup>b</sup> ± 0.6
	7		1.4 <sup>a</sup> ± 0.4	1.2 <sup>a</sup> ± 0.5	1.7 <sup>a</sup> ± 0.2		1.5 <sup>a</sup> ± 0.4	1.2 <sup>a</sup> ± 0.4
	14		2.7 <sup>b</sup> ± 0.9	2.7 <sup>b</sup> ± 0.9	3.7 <sup>a</sup> ± 0.4		3.7 <sup>a</sup> ± 0.6	4.1 <sup>a</sup> ± 0.2
	18		5.3 <sup>a</sup> ± 0.8	3.5 <sup>b</sup> ± 1.1	6.4 <sup>a</sup> ± 0.1		5.4 <sup>a</sup> ± 0.5	6.0 <sup>a</sup> ± 0.5
	21		5.8 <sup>b</sup> ± 1.2	3.8 <sup>c</sup> ± 0.9	6.9 <sup>a</sup> ± 0.3		6.7 <sup>a</sup> ± 0.7	7.1 <sup>a</sup> ± 0.4
Total bacteria	0	4.9 <sup>a</sup> ± 0.1	1.4 <sup>b</sup> ± 0.2	1.6 <sup>b</sup> ± 0.2	1.7 <sup>b</sup> ± 0.3	4.4 <sup>a</sup> ± 0.4	1.7 <sup>b</sup> ± 0.2	1.4 <sup>b</sup> ± 0.5
	7		1.4 <sup>a</sup> ± 0.4	1.4 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2		1.5 <sup>a</sup> ± 0.2	1.4 <sup>a</sup> ± 0.4
	14		2.8 <sup>b</sup> ± 0.8	2.5 <sup>b</sup> ± 0.6	3.6 <sup>a</sup> ± 0.3		3.8 <sup>a</sup> ± 0.6	3.7 <sup>a</sup> ± 0.3
	18		5.2 <sup>a</sup> ± 0.8	3.6 <sup>b</sup> ± 1.1	6.3 <sup>a</sup> ± 0.2		5.7 <sup>a</sup> ± 0.2	6.2 <sup>a</sup> ± 0.4
	21		6.2 <sup>b</sup> ± 0.7	3.9 <sup>c</sup> ± 0.9	6.9 <sup>a</sup> ± 0.3		7.4 <sup>a</sup> ± 0.4	7.1 <sup>a</sup> ± 0.4
Lactococci	0	4.9 <sup>a</sup> ± 0.3	1.5 <sup>b</sup> ± 0.1	1.5 <sup>b</sup> ± 0.4	1.7 <sup>b</sup> ± 0.3		1.4 <sup>b</sup> ± 0.6	1.3 <sup>b</sup> ± 0.8
	7		1.6 <sup>a</sup> ± 0.2	1.4 <sup>a</sup> ± 0.5	1.6 <sup>a</sup> ± 0.2		1.4 <sup>a</sup> ± 0.4	1.2 <sup>a</sup> ± 0.5
	14		2.9 <sup>b</sup> ± 0.9	2.5 <sup>b</sup> ± 0.9	3.8 <sup>a</sup> ± 0.3		3.8 <sup>a</sup> ± 0.4	4.1 <sup>a</sup> ± 0.3
	18		5.1 <sup>b</sup> ± 0.6	3.6 <sup>c</sup> ± 1.0	6.2 <sup>a</sup> ± 0.3		5.3 <sup>b</sup> ± 0.7	5.9 <sup>ab</sup> ± 0.2
	21		5.6 <sup>b</sup> ± 1.0	3.9 <sup>c</sup> ± 0.7	6.6 <sup>a</sup> ± 0.5		7.2 <sup>a</sup> ± 0.5	6.9 <sup>a</sup> ± 0.5
Coliforms	0	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	ND <sup>2</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	0.5 <sup>b</sup> ± 0.6	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
	7		ND	ND	ND		ND	ND
	14		ND	ND	ND		ND	ND
	18		ND	ND	ND		ND	ND
	21		ND	ND	ND		ND	ND
Lactobacilli	0	2.9 <sup>a</sup> ± 0.2	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	1.8 <sup>b</sup> ± 0.2	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
	7		ND	ND	ND		ND	ND
	14		ND	ND	ND		ND	ND
	18		ND	ND	ND		ND	ND
	21		ND	ND	ND		ND	ND
Enterococci	0	3.9 <sup>a</sup> ± 0.2	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	2.4 <sup>b</sup> ± 0.1	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
	7		ND	ND	ND		ND	ND
	14		ND	ND	ND		ND	ND
	18		ND	ND	ND		ND	ND
	21		ND	ND	ND		ND	ND
Spores	0	1.7 <sup>a</sup> ± 0.1	0.9 <sup>c</sup> ± 0.2	0.6 <sup>c</sup> ± 0.3	0.7 <sup>c</sup> ± 0.3	1.3 <sup>b</sup> ± 0.3	0.8 <sup>c</sup> ± 0.31	0.6 <sup>c</sup> ± 0.1
	7		0.8 <sup>a</sup> ± 0.3	0.6 <sup>a</sup> ± 0.2	0.8 <sup>a</sup> ± 0.1		0.7 <sup>a</sup> ± 0.19	0.5 <sup>a</sup> ± 0.3
	14		0.9 <sup>a</sup> ± 0.2	0.4 <sup>b</sup> ± 0.1	0.7 <sup>a</sup> ± 0.2		0.7 <sup>a</sup> ± 0.27	0.7 <sup>a</sup> ± 0.3
	18		0.9 <sup>c</sup> ± 0.2	1.0 <sup>c</sup> ± 0.3	1.7 <sup>b</sup> ± 0.2		1.5 <sup>b</sup> ± 1.04	2.8 <sup>a</sup> ± 0.6
	21		1.1 <sup>b</sup> ± 0.2	1.1 <sup>b</sup> ± 0.7	2.8 <sup>a</sup> ± 0.3		2.7 <sup>a</sup> ± 0.12	2.6 <sup>a</sup> ± 0.3
<i>Pseudomonas</i>	0	3.7 <sup>a</sup> ± 0.3	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	2.6 <sup>b</sup> ± 0.0	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
	7		ND	ND	ND		ND	ND
	14		ND	ND	ND		ND	ND
	18		ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>		2.1 <sup>b</sup> ± 2.5	4.5 <sup>a</sup> ± 0.2
	21		ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>		4.8 <sup>a</sup> ± 0.4	5.1 <sup>a</sup> ± 0.6

<sup>a-c</sup>Values in the same row with different superscripts differ significant ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Values are means ± standard deviations of duplicate analysis from 3 different productions.

<sup>2</sup>ND = not detected.

of bacteria in one or more sample units is “M” or more; c = number of sample units where the bacteria count may be between m and M, the sample being considered acceptable if the bacteria count of the other sample unit is m or less (European Union, 1992). Therefore, neither microbial changes nor physicochemical changes of milks treated at 100 MPa were studied during storage at 4°C.

No detectable levels of psychrotrophic bacteria at 200 and 250 MPa with inlet temperatures of 45°C and 55 to 70°C were reported by Hayes et al. (2005) and Smiddy et al. (2007), respectively by using a Stansted HP homogenizer (model nm-GEN 7400H). Lower reductions for this microbial group have been reported

by Thiebaud et al. (2003), who obtained 1.3 to 1.6 log cycle reductions at 200 MPa and  $T_i = 24^\circ\text{C}$  and 2.7 to 3.1 log cycle reductions at 300 MPa with the same  $T_i$  (Stansted HP homogenizer, model FPG7400 H).

By comparing psychrotrophic counts of each treatment during storage, no differences ( $P > 0.05$ ) were detected until d 14. This indicated that the lag phase ended approximately on the seventh day of storage, after which counts started to increase progressively. Psychrotrophic counts increased during storage in all milks, but rates between samples were different. At d 14 UHPH-treated milks at both pressures and  $T_i = 40^\circ\text{C}$ , and milks treated at 300 MPa at 30°C had higher counts than PA and 200 MPa at 30°C milks. At d 18,



all milks except those treated at 200 MPa at 30°C had psychrotrophic counts above the legal limit established for heat-treated milks, whereas milk treated at 200 MPa at 30°C remained below this limit even at 21 d of storage. This unexpected result (longer microbial shelf life with the lower pressure and  $T_i$  applied) could be related to the partial inactivation of LP that occurs in this treatment, whereas in the other treatments a complete inactivation of the enzyme was achieved (see results in LP and ALP determination). The LP system is a natural antimicrobial system of milk that is effective against some microorganisms. The central component of the system is the LP enzyme, which catalyzes the oxidation by hydrogen peroxide of thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) into hypothiocyanite ( $\text{OSCN}^-$ ). This last component acts at the bacterial cell membrane by oxidizing the sulfhydryl groups of proteins to disulfides. Barrett et al. (1999) found that milk pasteurized at 80°C for 15 s deteriorates faster than milk pasteurized at 72°C for 15 s. This phenomenon has been attributed to heat shocking of spores but it can also be related to the complete inactivation of LP that occurs at 80°C, whereas at 72°C, the residual LP activity was 70%. Vannini et al. (2004) reported that HPH and antimicrobial enzymes such as LP demonstrated an enhanced activity against several spoilage and pathogenic microorganisms. The authors attributed this phenomenon to an increased exposure of hydrophobic regions of proteins.

Total plate counts of raw milk were between  $5.9 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  cfu/mL. Both total plate count and lactococci bacteria showed a similar behavior as psychrotrophic bacteria, being initially reduced by 3.5 log. Saboya et al. (2003), working on cell suspensions, reported that to break 80% of lactococci cells, one pass at 200 MPa was required. In relation to total plate count, Thiebaud et al. (2003) obtained lower microbial reductions (1 to 1.15 log cfu/mL) working at 200 MPa and  $T_i = 24^\circ\text{C}$ . Kheadr et al. (2002) obtained 2 log cycles of inactivation for total counts in whole bovine milk (3.4% fat) after homogenization at 200 MPa (5 passes) with  $T_i = 28^\circ\text{C}$ . The reduction achieved in the present study was also higher than that obtained by Hayes et al. (2005) of 1.83 log cfu/mL working at 200 MPa and  $T_i = 45^\circ\text{C}$  and 3 log cfu/mL at 250 MPa, and it was similar to the reduction reached by Hayes and Kelly (2003a) of 75% of total bacterial count at 200 MPa. Smiddy et al. (2007) found a reduction of ~5 log units for UHPH-treated milk at 250 MPa but at inlet temperatures of 55 and 70°C.

Differences observed in total plate counts between this study and others could be explained by a combination of differences in the valve construction and machine design, as well as in the inlet temperature and

the time at which milk is maintained at the higher temperature reached during the treatment. In this study, the higher temperature reached was approximately 100°C especially in treatments at 300 MPa with  $T_i = 40^\circ\text{C}$ . However, as mentioned above, the temperature retention during treatment was very short (~0.7 s). In comparison, in the studies followed by Hayes and Kelly (2003a) and Hayes et al. (2005), the holding time at the outlet temperature was calculated to be 20 s; however, they reached lower microbial reductions compared with our results. Possible mechanisms of UHPH responsible for destruction of bacteria include sudden pressure drops, torsion and shear stresses, cavitation shock waves, turbulence, viscous shear, and high velocity collisions (Popper and Knorr, 1990; Wuytack et al., 2002; Hayes and Kelly, 2003a). Therefore, we can presume that homogenization valves and machine design could be one of the most important factors, although the temperature increase produced in the UHPH valve may also play an important role in microbial inactivation.

Some authors (Thiebaud et al., 2003; Hayes et al., 2005) found that reduction in total plate counts was pressure dependent, with better inactivation as homogenization pressure increased. However, in the present study, no significant differences were detected between UHPH samples (200 and 300 MPa) after treatment. Moreover, Hayes and Kelly (2003a) found that a 2-stage treatment had a greater destructive effect on milk microflora. In preliminary experiments, 2-stage homogenization treatments were also performed in our laboratories, but microbial counts were not improved compared with a single-stage treatment (results not shown); therefore, it was decided not to include these treatments in the study.

Coliform counts are widely used as a contamination index. An elevated number in milk indicates deficient handling during milking, collection, or manipulation. In the present study, coliform counts in raw milk were on average  $3.1 \times 10^4$  cfu/mL. Coliforms were completely inactivated by both heat and UHPH treatments, except at 100 MPa. Similar results were obtained by Hayes et al. (2005).

Enterococci were only detected in milk treated at 100 MPa. In spite of the fact that enterococci are highly resistant to freezing, drying, and heat treatments such as conventional pasteurization, it could be observed that UHPH treatments were very active against this microbial group. However, results published by Wuytack et al. (2002) have shown that enterococci were one of the most resistant microorganisms to UHPH obtaining a microbial inactivation of less than 1 log at a working pressure of 200 MPa.

Average lactobacilli counts of raw milk were  $7.94 \times 10^2$  cfu/mL. However, lactobacilli were absent in heat- and UHPH-treated milks, except for those undergoing the 100 MPa treatment, where 1.8 log units were detected. These results do not agree with those of Thiebaud et al. (2003), who obtained inactivation ratios of 1.0 to 1.6 and 1.2 to 2.3 at 200 and 300 MPa respectively, with  $T_i = 24^\circ\text{C}$ .

Undetectable levels of coliforms, enterococci, and lactobacilli were obtained in different milks during storage at  $4^\circ\text{C}$ . However, in the study of Smiddy et al. (2007), coliforms were detected at d 4 of storage in milk treated at 200 MPa and  $55^\circ\text{C}$ , and a slight increase of coliforms was observed at d 14 in milk treated at 200 MPa at  $70^\circ\text{C}$ .

Spore counts in raw milk ranged between  $3.99 \times 10$  and  $6.31 \times 10$  cfu/mL. Spores were highly resistant to heat and UHPH treatments, but they were reduced significantly for all UHPH and heat treatments, although not completely eliminated (0.8 to 1.1 logs of inactivation depending on the treatment), and the lower spore reduction achieved was for milk treated at 100 MPa (0.4 log of inactivation). As in the case of the other microbial groups, no significant differences were observed between samples up to 14 d of storage. At d 18 spore counts increased for all milks, but this increase was faster for milk treated at 300 MPa and  $40^\circ\text{C}$ , followed by treatments at 200 MPa at  $40^\circ\text{C}$  and 300 MPa at  $30^\circ\text{C}$ . Pasteurized and UHPH-treated milk at 200 MPa at  $30^\circ\text{C}$  had the lowest spore counts. Feijoo et al. (1997), studying the effect of HPH (microfluidization) on spores of ice cream at pressures from 50 to 200 MPa, obtained percentages of spore reduction from 6 to 68%. Their results showed that the number of spores was reduced by forces generated in the machine but that spores were not completely destroyed. In the same way, combinations of pressure and temperature used in this study were not sufficient to eliminate spores. Heat-resistant spores are usually present in raw milk and the literature suggests that there are some spore-forming microorganisms able to grow at refrigeration temperatures (Meer et al., 1991), which is in accordance with our results. These microorganisms with heat-resistant and psychrotrophic properties could present a problem for the milk shelf life.

Pseudomonads are one of the major microorganisms responsible for milk spoilage. At d 0, they were detected only in milk treated at 100 MPa. Levels of this group of microorganisms remained undetectable during storage in PA milk and milks treated at both pressures with  $T_i = 30^\circ\text{C}$ . However, bacterial growth in pseudomonas agar base medium was observed in UHPH-treated milks at  $40^\circ\text{C}$  during the last days of storage. The increase in microbial counts was higher for

milk treated at 300 MPa (4.5 log cycles) than for that treated at 200 MPa (2.1 log cycles). No detectable levels at d 0 in milks treated at pressures  $\geq 200$  MPa are in accordance with the results of Wuytack et al. (2002) and Smiddy et al. (2007). In the latter study, an increase of pseudomonads was also observed during storage for all UHPH treatments.

No *Salmonella* spp. or *L. monocytogenes* were detected in any raw milk sample using the protocols described above. Therefore, we can draw no conclusion about the efficiency of UHPH treatments on the destruction of these pathogenic microorganisms. However, some studies on the destruction of foodborne pathogens in milk have been carried out by different researchers. Briñez et al. (2006a,b) inoculated 2 different strains of *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 10536 and *E. coli* O157:H7 CCUG 44857) and *Listeria innocua* in milk and, using  $T_i = 20^\circ\text{C}$  and 300 MPa in the first homogenizing valve and 30 MPa in the second valve, obtained lethality values of 4.3, 3.94, and 4.31 log, respectively. Vachon et al. (2002) found that *L. monocytogenes* was more resistant to the pressure treatments than *Salmonella*. For *Salmonella enteritidis*, they obtained a reduction of 4 log and complete inactivation at 200 and 300 MPa, respectively ( $T_i = 25^\circ\text{C}$ ), whereas complete inactivation of *L. monocytogenes* was only achieved by applying 300 MPa for 3 passes.

### Particle Size Determination

The particle size distribution curve of raw milk was characterized by a main peak at  $3.7 \mu\text{m}$  that corresponds to fat globules and a small peak at  $0.2 \mu\text{m}$  that corresponds to casein micelles. Curves of size distribution for PA- and UHPH-treated milks at 200 MPa were characterized by one peak, whereas milks treated at 300 MPa showed the presence of a second small peak at higher diameters due to the formation of large particles or fat aggregates. Fat globules  $<0.6 \mu\text{m}$  represented approximately 90 and 95% of the total fat volume at 300 MPa at 40 and  $30^\circ\text{C}$ , respectively, whereas fat aggregates  $>1 \mu\text{m}$  were about 10 and 5% of the total fat volume at 300 MPa at 40 and  $30^\circ\text{C}$ , respectively. The polydisperse distributions obtained for 300 MPa are in accordance with results of Thiebaud et al. (2003). These clusters can be formed through shared protein constituents adsorbed onto the surface (Thiebaud et al., 2003) or by coalescence of fat globules. The formation of clusters of fat globules can originate from different causes. One explanation was given by Hayes et al. (2005) who stated that at higher pressures there would be more exposed fat interface. The amount of casein may become limiting, resulting in insufficiently covered fat globules that can agglomerate. Floury et

**Table 3.** Fat globule size parameters for raw and treated milks<sup>1</sup>

Treatment	Fat globule size parameter <sup>2</sup>			
	D50	D90	D <sub>3,2</sub>	D <sub>4,3</sub>
Raw	3.05 <sup>a</sup> ± 0.03	5.08 <sup>a</sup> ± 0.08	0.55 <sup>a</sup> ± 0.02	2.80 <sup>a</sup> ± 0.04
Pasteurized <sup>3</sup>	0.38 <sup>b</sup> ± 0.01	0.92 <sup>bc</sup> ± 0.03	0.30 <sup>b</sup> ± 0.00	0.47 <sup>c</sup> ± 0.01
200 MPa at 30°C	0.14 <sup>d</sup> ± 0.01	0.32 <sup>c</sup> ± 0.06	0.20 <sup>c</sup> ± 0.11	0.17 <sup>c</sup> ± 0.02
200 MPa at 40°C	0.12 <sup>e</sup> ± 0.01	0.23 <sup>c</sup> ± 0.00	0.11 <sup>d</sup> ± 0.00	0.14 <sup>c</sup> ± 1.07
300 MPa at 30°C	0.15 <sup>cd</sup> ± 0.00	0.36 <sup>c</sup> ± 0.07	0.14 <sup>d</sup> ± 0.00	1.97 <sup>b</sup> ± 1.07
300 MPa at 40°C	0.16 <sup>c</sup> ± 0.01	1.38 <sup>b</sup> ± 1.59	0.15 <sup>cd</sup> ± 0.01	2.32 <sup>ab</sup> ± 0.56

<sup>a-e</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Values are means ± standard deviations of triplicate analysis from 3 different productions.

<sup>2</sup>D50 = diameter below which 50% of the volume of particles are found; D90 = diameter below which 90% of the volume of particles are found; D<sub>3,2</sub> = Sauter diameter (surface-weighted mean diameter); D<sub>4,3</sub> = volume-weighted mean diameter.

<sup>3</sup>Pasteurized = high-pasteurized milk, 90°C for 15 s.

al. (2000) suggested that at pressure of 300 MPa, whey proteins are denatured and would not be able to stabilize fat globules.

Fat globule size parameters (D90, D50, D<sub>3,2</sub>, and D<sub>4,3</sub>) for the different milks are shown in Table 3. As expected, PA milk obtained by traditional homogenization underwent a reduction in milk fat globule size ( $P < 0.05$ ) in terms of all parameters studied compared with raw milk. The reduction in fat globule size achieved in UHPH-treated milks at 200 MPa (Ti = 30 and 40°C) was higher than that obtained by traditional homogenization. Although milks treated at 200 MPa were numerically smaller than pasteurized milk for all fat globule size parameters, significant differences were only detected for the D50 and D<sub>3,2</sub> values. The UHPH treatment achieved a great reduction of particle size at 200 MPa; however, no further reduction could be obtained at 300 MPa. Milks treated at 300 MPa showed a significantly lower D50 value compared with PA milk but slightly higher compared with milks treated at 200 MPa. The D<sub>4,3</sub> parameter is very sensitive to the presence of small amounts of large particles. At 300 MPa, an increase in D<sub>4,3</sub> was observed, which is in relation to the formation of aggregates previously mentioned.

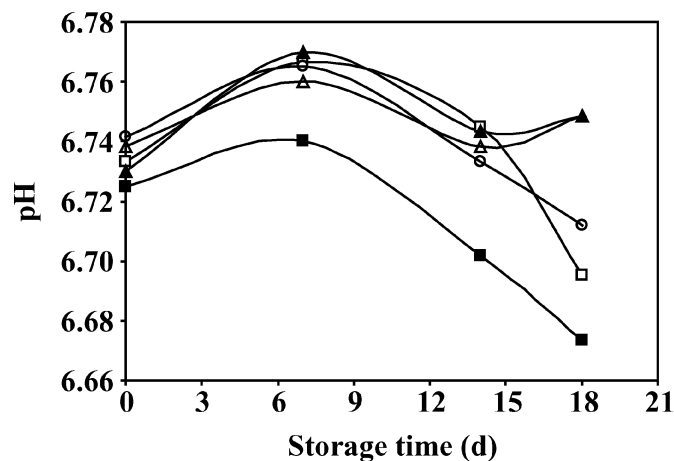
### pH and Total Acidity

Immediately after treatment, small but significant differences were detected in the pH value of milk treated at 200 MPa at 30°C (~6.72) compared with raw milk and to the other treated milks (~6.74). For each day of sampling, the pH of milks treated at 200 MPa at 30°C was always below the pH values of the other milks as can be seen in Figure 1.

After 18 d of storage, a decrease in pH was observed except for pasteurized milks and milks treated at 300 MPa at 30°C, which had a constant pH until the end

of storage. The reduction in pH was accompanied by an increase in acidity.

Hayes and Kelly (2003a) explained that the decrease in pH of homogenized milks observed after 24 h of storage at 4°C could be related to the partial inactivation of milk lipoprotein lipase (LPL). This fact could explain the marked pH reduction that occurred at 200 MPa at 30°C. Lipoprotein lipase is an enzyme associated with the casein micelle. Due to destruction of milk fat globule membrane and reduction of fat globules after treatment, LPL can easily access the fat and can find greater interfacial fat surface area on which to act. In this study the constant pH value for PA milks and milks treated at 300 MPa and 30°C could be related to the temperature achieved, at which complete inactivation of LPL could be obtained. A preliminary experiment performed in our laboratories (unpub-



**Figure 1.** Evolution of pH during refrigerated storage at 4°C of treated milks: 200 MPa at 30°C (■), 200 MPa at 40°C (□), 300 MPa at 30°C (▲), 300 MPa at 40°C (○), and high-pasteurized at 90°C for 15 s (△).



**Table 4.** Peroxidase and phosphatase activities for raw and treated milks<sup>1</sup>

Treatment	Peroxidase (U/mL)	Phosphatase (U/mL)
Raw milk	1.34 <sup>a</sup> ± 0.03	0.88 <sup>a</sup> ± 0.01
Pasteurized <sup>2</sup>	ND <sup>c,3</sup>	ND <sup>b</sup>
200 MPa at 30°C	0.46 <sup>b</sup> ± 0.01	ND <sup>b</sup>
200 MPa at 40°C	0.01 <sup>c</sup> ± 0.00	ND <sup>b</sup>
300 MPa at 30°C	ND <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>
300 MPa at 40°C	ND <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>Different superscripts indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Data are means ± standard deviations of triplicate analysis from 3 different productions.

<sup>2</sup>Pasteurized = high-pasteurized milk (90°C for 15 s).

<sup>3</sup>ND = not detected.

lished results) on whole milk at the inlet temperatures mentioned above, with the aim to verify the effect of UHPH treatments (100 to 300 MPa) on milk lipase (assessed by total free fatty acids determination after treatment), showed that there is a positive effect of pressure on the inactivation of lipase. However, total inactivation of milk lipase was not achieved at 100 to 200 MPa at 30°C.

Surprisingly, at 300 MPa at 40°C (the most intense treatment), a reduction of pH during storage at 4°C was observed. At this treatment, a T2 around 100°C (able to inactivate LPL) was achieved; therefore, this behavior could be explained by the production of microbial lipases from psychrotrophic bacteria, mostly pseudomonads, which are stable at high temperatures and survive pasteurization and UHT treatments (Stepaniak and Sorhaug, 1995). Pseudomonads were present at the end of storage in milks treated at 300 and 200 MPa at Ti = 40°C. Production of enzymes at low temperatures is limited but possible for the pseudomonads. Hayes et al. (2005) reported a pH decrease at 150 MPa, but no decrease at 200 or 250 MPa after 14 d of storage at 4°C. This finding strengthens the results of the present study because the pH decrease was observed from d 18. However, the reduction in milk pH could also be related to the production of lactic acid by microorganisms. A good correlation between acidity and concentration of microorganisms was found by Odriozola-Serrano et al. (2006). Additional work is being carried out in our laboratories to prove these hypotheses about the reduction of pH in UHPH-treated milks at 300 MPa at 40°C.

### LP and ALP Determinations

The effect of heat and UHPH treatments on LP and ALP was evaluated by determining the residual enzymatic activities (Table 4). Lactoperoxidase is an enzyme that is relatively sensitive to heat. As can be

seen, heat treatment at 90°C for 15 s completely inactivated LP, as occurs with high-pasteurized milks. Temperature achieved during UHPH treatments at 300 MPa also produced total enzyme inactivation. Milk treated at 200 MPa at 40°C had a residual activity less than 1%; however, only milk treated at 200 MPa at 30°C showed significant differences compared with the other UHPH-treated milks. This treatment was able to reduce LP, but a residual activity of 35% was maintained. Residual LP activities in milk of 70, 40, and 0% were observed by Barrett et al. (1999) for treatments at 72°C for 15 s, 72°C for 80 s, and 80°C for 15 s, respectively. It seems that LP can remain active depending on the temperature–time combination applied, being very sensitive to temperatures around 80°C. Working with UHPH at Ti = 45°C, Hayes et al. (2005) reported 91, 34, and 0% of residual LP activity at 150, 200, and 250 MPa, respectively. These results are similar to those observed in this study. Treatment at 200 MPa and Ti = 40°C inactivated almost 100% of the enzyme. Differences in enzyme inactivation between various studies could be due to differences in T2 temperature and holding time: 77°C for 20 s in the study of Hayes et al. (2005) and 84°C for 0.7 s in this study. These results agree with the study of Barrett et al. (1999), in which the holding time had a limited effect on heat inactivation in the range of 68 to 80°C. The LP inactivation achieved by Hayes et al. (2005) at 200 MPa was similar to that obtained in this study at 200 MPa with Ti = 30°C where milk reached a T2 of ~78°C. Therefore, the relevant factor in relation to LP inactivation by UHPH could be ascribed to the temperature achieved by samples (T2) in the different treatments, which depends on the inlet temperature and pressure applied.

Both heat and UHPH treatments achieved complete inactivation of ALP. Hayes et al. (2005) had no measurable ALP activity in pasteurized, homogenized commercial milk and in UHPH-treated milk at 250 MPa. However, residual activity of 2 and 29% was observed at 200 MPa and 150 MPa, respectively (Ti = 45°C). Hayes and Kelly (2003b), using a qualitative assay, obtained positive results for milks treated from 50 to 200 MPa with inlet temperatures of 6 to 9°C. However, temperatures reached during treatments never exceeded 53°C. Alkaline phosphatase is an enzyme that is associated with the MFGM and usually a treatment of 72°C for 15 s is enough to inactivate it. The total inactivation of ALP achieved in this study could be due to different factors: the milk fat globule size reduction (which implies the destruction of milk fat globule membrane), the temperatures achieved before the second homogenization valve, and the high shear forces produced during treatment.

**Table 5.** Changes in color of different milks during storage at 4°C<sup>1</sup>

Color parameter	Treatment					
	Raw	Pasteurized: 90°C for 15 s	200 at 30°C	300 at 30°C	200 at 40°C	300 at 40°C
Day 0						
L	90.28 <sup>c</sup> ± 0.18	93.24 <sup>a</sup> ± 0.03	92.68 <sup>b</sup> ± 0.16	92.77 <sup>b</sup> ± 0.11	92.73 <sup>b</sup> ± 0.06	92.72 <sup>b</sup> ± 0.14
a	-1.58 <sup>a</sup> ± 0.03	-1.64 <sup>a</sup> ± 0.08	-1.64 <sup>a</sup> ± 0.06	-1.49 <sup>b</sup> ± 0.07	-1.88 <sup>b</sup> ± 0.16	-2.01 <sup>c</sup> ± 0.09
b	9.6 <sup>a</sup> ± 0.16	8.68 <sup>b</sup> ± 0.14	8.09 <sup>c</sup> ± 0.17	7.79 <sup>d</sup> ± 0.14	7.84 <sup>d</sup> ± 0.17	7.80 <sup>d</sup> ± 0.17
Day 7						
L		93.40 <sup>a</sup> ± 0.05	92.94 <sup>d</sup> ± 0.17	93.15 <sup>b</sup> ± 0.21	93.08 <sup>bc</sup> ± 0.24	93.01 <sup>dc</sup> ± 0.19
a		-1.68 <sup>c</sup> ± 0.07	-1.58 <sup>a</sup> ± 0.05	-1.99 <sup>d</sup> ± 0.08	-1.91 <sup>c</sup> ± 0.06	-2.07 <sup>e</sup> ± 0.07
b		8.83 <sup>a</sup> ± 0.21	8.24 <sup>b</sup> ± 0.20	7.95 <sup>c</sup> ± 0.19	7.93 <sup>c</sup> ± 0.17	7.93 <sup>c</sup> ± 0.17
Day 14						
L		93.37 <sup>a</sup> ± 0.11	92.94 <sup>b</sup> ± 0.06	92.92 <sup>b</sup> ± 0.32	92.88 <sup>b</sup> ± 0.17	92.99 <sup>b</sup> ± 0.15
a		-1.69 <sup>b</sup> ± 0.05	-1.54 <sup>a</sup> ± 0.11	-1.99 <sup>d</sup> ± 0.06	-1.87 <sup>c</sup> ± 0.06	-2.04 <sup>e</sup> ± 0.06
b		8.92 <sup>a</sup> ± 0.20	8.29 <sup>b</sup> ± 0.22	8.08 <sup>c</sup> ± 0.22	8.08 <sup>c</sup> ± 0.29	8.11 <sup>c</sup> ± 0.15
Day 18						
L		93.42 <sup>a</sup> ± 0.17	92.92 <sup>c</sup> ± 0.09	93.12 <sup>b</sup> ± 0.14	93.06 <sup>bc</sup> ± 0.16	92.97 <sup>bc</sup> ± 0.13
a		-1.72 <sup>b</sup> ± 0.03	-1.59 <sup>a</sup> ± 0.07	-2.01 <sup>d</sup> ± 0.06	-1.90 <sup>c</sup> ± 0.05	-2.08 <sup>e</sup> ± 0.04
b		8.98 <sup>a</sup> ± 0.18	8.35 <sup>b</sup> ± 0.19	8.12 <sup>c</sup> ± 0.23	8.13 <sup>c</sup> ± 0.35	8.14 <sup>c</sup> ± 0.17
Day 21						
L		93.35 <sup>a</sup> ± 0.19	93.09 <sup>ab</sup> ± 0.19	93.32 <sup>b</sup> ± 0.15	93.14 <sup>b</sup> ± 0.04	93.09 <sup>b</sup> ± 0.38
a		-1.80 <sup>b</sup> ± 0.10	-1.63 <sup>a</sup> ± 0.17	-2.11 <sup>d</sup> ± 0.17	-1.99 <sup>c</sup> ± 0.09	-2.05 <sup>cd</sup> ± 0.18
b		8.99 <sup>a</sup> ± 0.22	8.41 <sup>b</sup> ± 0.23	8.15 <sup>c</sup> ± 0.18	8.18 <sup>c</sup> ± 0.32	7.88 <sup>d</sup> ± 0.21

<sup>a-e</sup>Different superscripts in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Data are means ± standard deviations of triplicate analysis from 3 different productions.

## Color

Significant differences ( $P < 0.05$ ) in L\* values were observed between raw, PA-, and UHPH-treated milks at d 0 (Table 5). Pasteurized milk was whiter than UHPH-treated milks and raw milk; nevertheless, differences in instrumental color measurements were not visually obvious.

No significant differences among raw milk, PA milk, and milk treated at 200 MPa at 30°C were detected in relation to a\* value. All of these treatments exhibited more negative a\* values (which indicates more green) compared with other treatments. In relation to b\* values, raw milk had the highest value, which was significantly different from PA and UHPH-treated milks. No significant differences were detected between milks treated at 300 MPa at both inlet temperatures and 200 MPa at 40°C. The decrease in milk b\* value was in the order of raw > pasteurized > 200 MPa at 30°C > 300 MPa at 30°C = 200 MPa at 40°C = 300 MPa at 40°C.

Increased lightness of PA- and UHPH-treated milks and small changes in a\* and b\* values after treatment compared with raw milk were also observed by Hayes and Kelly (2003a) and Hayes et al. (2005). Treated milks were whiter than raw milk due to the increase of fat globules, which diffract light more efficiently. On the other hand, differences between UHPH-treated milks and conventional homogenized milk could be related to the state of the casein micelles. In general, lower L\* values indicate disintegration of the casein

micelles (O'Sullivan et al., 2002). In this study, the average casein micelle size was not studied; however, no change in micelle size at pressures below 150 MPa but a 5% decrease in micelle size in samples homogenized at 200 MPa was observed by Hayes and Kelly (2003a) in skim milk. Therefore, we could suppose that conventional homogenized milk was whiter than UHPH-treated milks due to a lesser reduction in micelle casein size.

During storage, PA-treated milk always had a higher L\* value compared with UHPH-treated milks. Over time, the lightness (L\*) of all milks did not show a defined tendency, but in general, an increase ( $P < 0.05$ ) in this parameter was observed between d 0 and 21. The a\* value remained largely unchanged during storage, whereas b\* showed a tendency to a linear increase.

## Viscosity

Viscosity, besides affecting the flow conditions in dairy processes, is an important physical property related to milk shelf life because it is associated with the rate of creaming. Viscosity values measured in milks treated at 200 MPa were significantly different from those of raw, PA, and UHPH-treated milks at 300 MPa (Table 6). At each sampling time during the storage study, milks treated at 200 MPa always had the lowest viscosity value ( $P < 0.05$ ). During milk storage an increase ( $P < 0.05$ ) of viscosity was observed, but increases after d 7 were not significantly different,

**Table 6.** Evolution of viscosity (mPa × s) of raw and treated milks during storage at 4°C<sup>1</sup>

Milk	Storage day				
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 18	Day 21
Raw	2.405 <sup>a</sup> ± 0.118				
Pasteurized <sup>2</sup>	2.409 <sup>a</sup> ± 0.043	2.552 <sup>a</sup> ± 0.029	2.592 <sup>b</sup> ± 0.039	2.553 <sup>a</sup> ± 0.150	2.647 <sup>a</sup> ± 0.077
200 MPa at 30°C	2.274 <sup>b</sup> ± 0.038	2.346 <sup>c</sup> ± 0.027	2.368 <sup>c</sup> ± 0.035	2.375 <sup>b</sup> ± 0.023	2.433 <sup>c</sup> ± 0.022
300 MPa at 30°C	2.425 <sup>a</sup> ± 0.050	2.524 <sup>ab</sup> ± 0.056	2.543 <sup>b</sup> ± 0.032	2.541 <sup>a</sup> ± 0.097	2.554 <sup>b</sup> ± 0.040
200 MPa at 40°C	2.240 <sup>b</sup> ± 0.035	2.314 <sup>c</sup> ± 0.031	2.348 <sup>c</sup> ± 0.048	2.348 <sup>b</sup> ± 0.032	2.363 <sup>c</sup> ± 0.031
300 MPa at 40°C	2.385 <sup>a</sup> ± 0.059	2.505 <sup>b</sup> ± 0.026	2.651 <sup>a</sup> ± 0.082	2.624 <sup>a</sup> ± 0.055	2.727 <sup>a</sup> ± 0.146

<sup>a-c</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Data are means ± standard deviations of duplicate analysis from three different productions.

<sup>2</sup>Pasteurized = high-pasteurized milk, 90°C for 15 s.

except for milk treated at 300 MPa at 40°C, which showed a marked change at d 14 of storage. Regardless of the differences in instrumental viscosity measurements, they were not visibly obvious.

Viscosity can be influenced by particle size (Floury et al., 2000), casein micelle aggregates (Walstra and Jenness, 1984), and denaturation of whey proteins by heat (Clare et al., 2005). The UHPH treatments reduced particle size; however, milks treated at 300 MPa were characterized by the formation of large particles or fat aggregates, whereas this behavior was not observed at 200 MPa. The formation of these clusters could explain the higher viscosity values from milks treated at 300 MPa. To date, studies of viscosity on UHPH-treated milks from 200 to 300 MPa have not been published. Floury et al. (2000), working with oil in water emulsions in a range of pressures from 20 to 150 MPa, found that as pressure increased, the mean droplet diameters, the droplet size distributions, and viscosity of emulsions decreased. Recoalescence was observed at pressures of 300 MPa; however, and in disagreement with our results, at this pressure the lowest value of viscosity was measured.

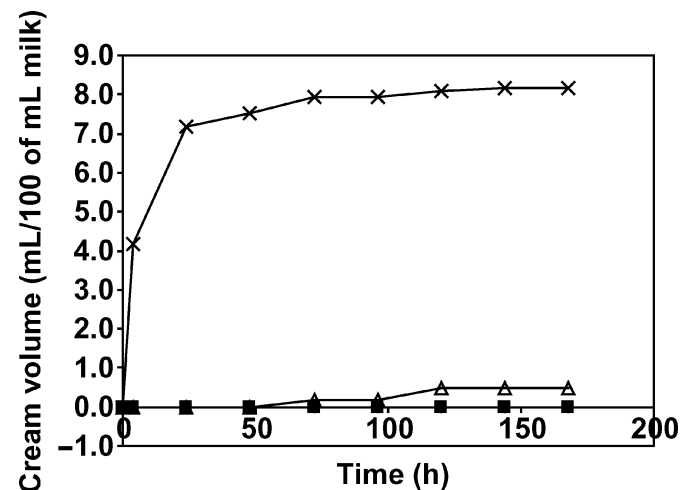
### Rate of Creaming

The effect of storage time on the rate of creaming is shown in Figure 2. After the first 4 h of storage at 4°C, untreated raw milk showed an initial creaming of 4 mL/100 mL of milk. The rate of creaming showed a rapid increase until 120 h where it reached a cream layer of approximately 8 mL/100 mL of milk, which remained more or less constant until 168 h of storage. According to Stokes' law, the cream separation rate, which is due to the density difference between the fat and aqueous phases, can be decreased by reducing milk fat globule size. Due to the reduction in particle size achieved, no creaming was observed in UHPH-treated milks during refrigerated storage. In spite of the presence of aggregates in milks treated at 300 MPa

at inlet temperatures of 30 and 40°C, creaming was not observed during storage at 4°C. The same effect was observed by Thiebaud et al. (2003), and they supposed that these particles might correspond to fat clusters formed with protein adsorbed at the surface rather than through coalescence of fat globules. The larger fat globules detected for conventional homogenized milk could be the cause of the reduced rate of creaming observed (0.5 mL/100 mL of milk), which agrees with the results obtained by Hayes et al. (2005). However, differences between PA- and UHPH-treated milks were not significant.

### CONCLUSIONS

In general, the microbial results of this study were very promising. Milk treated at 200 MPa at 30°C had



**Figure 2.** Effect of refrigerated storage time (h) on the rate of creaming of raw milk (x) and treated milks: 200 MPa at 30°C (■), 200 MPa at 40°C (□), 300 MPa at 30°C (▲), 300 MPa at 40°C (○), and high-pasteurized at 90°C for 15 s (△). Results for all ultra-high pressure homogenized samples (■, □, ▲, and ○) were identical and therefore the symbols are overlaid.

the longest microbial shelf life (approximately 21 d) and achieved an outlet temperature of ~80°C for 0.7 s, which means that the thermal effect on milk was less than that of the high pasteurization treatment. However, at 200 MPa and 30°C, a marked decrease of milk pH was observed. With the other UHPH treatments, a microbial shelf life between 14 and 18 d, similar to that observed for high-pasteurized milk, was obtained. Therefore, the microbial data indicate the possibility of obtaining UHPH-treated milk with equal or better microbial shelf life than high-pasteurized milk.

The UHPH treatment, besides achieving a reduction in microbial counts, generated changes in the physicochemical properties such as color, viscosity, pH, and acidity. Color, texture, and mouthfeel are important signals that determine consumer perception of freshness of milk. Nevertheless, differences in instrumental color and viscosity measurements between UHPH-treated milks and PA milks were not visually or sensorially obvious. The UHPH treatment also significantly affected fat globule size, with the formation of aggregates on some occasions; however, no creaming was observed in any UHPH sample.

The treatment performed at 300 MPa at 30°C could be a good option to be used as a one-step homogenization and pasteurization treatment to produce commercial milk with a microbial and physicochemical shelf life equal to that of high-pasteurized milk, and probably with reduced heat effects due to the short holding time needed during treatment. However, further research, which is being carried out currently, is required to evaluate the effects of UHPH on the sensory and nutritional aspects of milk.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the European Union for the financial support given to this investigation (CRAFT project 512626), and Julieta Pereda acknowledges a predoctoral fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). Moreover, we wish to thank P. Jaramillo for her help in physicochemical analysis and M. Hernández for her assistance in microbiology.

### REFERENCES

- Andersson, I., and R. Oste. 1995. Nutritional quality of heat processed liquid milk. Pages 279–301 in *Heat-Induced Changes in Milk*. International Dairy Federation, ed. IDF, Brussels, Belgium.
- Barrett, N. E., A. S. Grandison, and M. J. Lewis. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 66:73–80.
- Briñez, W. J., A. X. Roig-Sagués, M. M. Hernandez Herrero, and B. Guamis Lopez. 2006a. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. *J. Food Prot.* 69:86–92.
- Briñez, W. J., A. X. Roig-Sagués, M. M. Hernandez Herrero, and B. Guamis Lopez. 2006b. Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation. *Lait* 86:241–249.
- Chávarri, F., A. Santisteban, M. Virto, and M. de Renobales. 1998. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lactoperoxidase, and lipoprotein lipase activities in industrial ewe's milk and cheese. *J. Agric. Food Chem.* 46:2926–2932.
- Clare, D. A., W. S. Bang, G. Cartwright, M. A. Drake, P. Coronel, and J. Simunovic. 2005. Comparison of sensory, microbiological, and biochemical parameters of microwave versus indirect UHT fluid milk during storage. *J. Dairy Sci.* 88:4172–4182.
- European Union. 1992. European Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992. Laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. *Off. J. L* 268:1–32.
- Feijoo, S. C., W. W. Hayes, C. E. Watson, and J. H. Martin. 1997. Effects of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* spores in ice cream. *J. Dairy Sci.* 80:2184–2187.
- Floury, J., A. Desrumaux, and J. Lardieres. 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1:127–134.
- Hayes, M. G., P. F. Fox, and A. L. Kelly. 2005. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *J. Dairy Res.* 72:25–33.
- Hayes, M. G., and A. L. Kelly. 2003a. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *J. Dairy Res.* 70:297–305.
- Hayes, M. G., and A. L. Kelly. 2003b. High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *J. Dairy Res.* 70:307–313.
- IDF. 1981. Milk determination of fat content. Butyrometer Gerber. IDF Standard 105. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- IDF. 1987. Milk, cream and unsweetened evaporated milk. Determination of total solid content. IDF Standard 21B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- IDF. 2002. Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. IDF Standard 185. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Kheadr, E. E., J. F. Vachon, P. Paquin, and I. Fliss. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12:435–446.
- Meer, R. R., J. Baker, W. Bodyfelt, and M. W. Griffiths. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. *J. Food Prot.* 54:969–979.
- Nursten, H. E. 1995. Heat-induced changes in the flavour of milk. Pages 308–315 in *Heat-Induced Changes in Milk*. International Dairy Federation, ed. IDF, Brussels, Belgium.
- Odrizola-Serrano, I., S. Bendicho-Porta, and O. Martín-Belloso. 2006. Comparative study on shelf life of whole milk processed by high-intensity pulsed electric field or heat treatment. *J. Dairy Sci.* 89:905–911.
- O'Sullivan, M. M., A. L. Kelly, and P. F. Fox. 2002. Influence of transglutaminase treatment on some physico chemical properties of milk. *J. Dairy Res.* 69:332–341.
- Pereda, J., V. Ferragut, B. Guamis, and A. Trujillo. 2006. Effect of ultra high-pressure homogenisation on natural occurring microorganisms in bovine milk. *Milchwissenschaft* 61:245–248.
- Popper, L., and D. Knorr. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technol. Julio*:84–89.
- Saboya, L. V., M. B. Maillard, and S. Lortal. 2003. Efficient mechanical disruption of *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* and *Propionibacterium freudenreichii* by a new high-pressure homogenizer and recovery of intracellular aminotransferase activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:1–5.



- Shindler, J., R. Childs, and W. Bardsley. 1976. Peroxidase from human cervical mucus. The isolation and characterisation. *Eur. J. Biochem.* 65:325–331.
- Singh, H. 1995. Heat-induced changes in casein, including interactions with whey proteins. Pages 349–363 in *Heat-Induced Changes in Milk*. International Dairy Federation, ed. IDF, Brussels, Belgium.
- SAS Institute. 2004. User's Guide. Version 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Smiddy, M. A., J. Martin, T. Huppertz, and A. L. Kelly. 2007. Microbial shelf life of high-pressure-homogenised milk. *Int. Dairy J.* 17:29–32.
- Stepaniak, L., and T. Sorhaug. 1995. Thermal denaturation of bacterial enzymes in milk. Pages 349–363 in *Heat-Induced Changes in Milk*. International Dairy Federation, ed. IDF, Brussels, Belgium.
- Thiebaud, M., E. Dumay, L. Picart, J. P. Guiraud, and J. C. Cheftel. 2003. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* 13:427–439.
- Vachon, J. F., E. E. Kheadr, J. Giasson, P. Paquin, and I. Fliss. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *J. Food Prot.* 65:345–352.
- Vannini, L., R. Lanciotti, D. Baldi, and M. E. Guerzoni. 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *Int. J. Food Microbiol.* 94:123–135.
- Walstra, P., and R. Jenness. 1984. Rheological properties. Pages 290–300 in *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Wuytack, E. Y., A. M. J. Diels, and C. W. Michiels. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 77:205–212.





### *Artículo 3*

#### **3.3 CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN ULTRA-HIGH-PRESSURE HOMOGENIZED MILK.**

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.  
*International Dairy Journal*, vol 18, pp. 826-834. (2008).



# Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk

J. Pereda, D.P. Jaramillo, J.M. Quevedo, V. Ferragut, B. Guamis, A.J. Trujillo\*

*Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XaRTA, XiT, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

Received 14 June 2007; received in revised form 6 December 2007; accepted 10 December 2007

## Abstract

The effect of ultra-high-pressure homogenization (UHPH) on the volatile profile of milk was studied and compared with thermal treatments. Milk was treated at 200 and 300 MPa with inlet temperatures of 30 and 40 °C. UHPH-treated milk samples were compared with high-pasteurized milk (PA; 90 °C, 15 s) and to commercial UHT, in-bottle sterilized and pasteurized milk types. Volatiles were extracted by solid phase micro-extraction and were identified by gas chromatography/mass spectrometry. Volatile profiles showed that UHPH-treated milk at 200 MPa produced fewer carbonyl compounds than PA and 300 MPa milk samples but there was a high level of hexanoic acid, related to rancid flavors. Milk treated at 300 MPa showed higher aldehyde content compared with PA milk, but lower compared with commercial milk samples (UHT, in-bottle sterilized and pasteurized). No differences were detected in relation to dimethyl sulfide. Heat treatment resulted in an increase in aldehydes and methyl ketones with increased severity of treatment. UHPH technology induced an increase in aldehydes alone.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Pasteurization is a thermal process usually applied to milk with the aims of reducing the number of spoilage bacteria (which can create negative sensory attributes and decrease the shelf-life of processed milk) and achieving microbial safety. Milk can be heated rapidly to 72 °C for 15–20 s (high temperature short-time pasteurization) or heated to 80–90 °C for 15 s (high-pasteurization). However, the shelf-life of milk is not only determined by the growth of microorganisms. Even if milk is within microbiological limits, its flavor is an important factor that will determine consumer acceptance. The kind and extent of heated milk flavor depends on the intensity of the thermal treatment (Calvo & de la Hoz, 1992). Ultra-high-temperature (UHT) processing offers the advantage of a product, which is stable at room temperature for up to 6 months compared with the shorter shelf-life (14–18 days) of high-pasteurized milk. However, UHT treatment can promote the development of

thermally derived off-flavor compounds such as aldehydes, methyl ketones and sulfur compounds (Contarini & Povolo, 2002; Contarini, Povolo, Leardi, & Toppino, 1997; Vazquez-Landaverde, Velazquez, Torres, & Qian, 2005).

The increased consumer demand for tasty, nutritious and natural products has generated a desire in the milk-processing industry to obtain milk with a microbial shelf-life similar to that of UHT milk but without compromising its flavor. Alternative non-thermal technologies are being studied in order to achieve this goal. Microfiltration using cross flow membrane separation has proved to be useful in eliminating bacteria from skim milk, but not from whole milk (Elwell & Barbano, 2006; Rysstad & Kolstad, 2006). The effect of high hydrostatic pressure on the volatile profile of milk has been studied and compared with that of heat treatments. High pressure processing (480–620 MPa) at low temperature (25 °C) causes a minimum change of volatile compounds in milk, although, high pressure at high temperature (over 60 °C) favors the formation of aldehydes, while heat treatment at high temperature (60–80 °C) promotes the formation both of aldehydes and of methyl ketones (Vazquez-Landaverde, Torres, & Qian,

\*Corresponding author. Tel: +34 935813292; fax: +34 935812006.

E-mail address: [Toni.Trujillo@uab.es](mailto:Toni.Trujillo@uab.es) (A.J. Trujillo).

2006a). One of the most recent developments is a new high-pressure process called ultra-high-pressure homogenization (UHPH). The principle of the operation is similar to that of conventional homogenizers used in the dairy industry with the difference that it works at higher pressures (up to 400 MPa). This technology is particularly interesting for food technology and especially for dairy processing. Several studies have recently been carried out on the effect of UHPH on different characteristics of milk. Data of microorganism inactivation in milk have demonstrated the efficiency of UHPH treatments to reduce microbial counts and to obtain a microbial shelf-life similar to that of high-pasteurized milk (Briñez, Roig-Sagués, Hernández-Herrero, & Guamis, 2006; Hayes, Fox, & Kelly, 2005; Pereda, Ferragut, Guamis, & Trujillo, 2006; Pereda, Ferragut, Quevedo, Guamis, & Trujillo, 2007; Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud, & Cheftef, 2003). UHPH has been reported to cause some physico-chemical modifications in milk and milk products such as inactivation of enzymes (Hayes & Kelly, 2003a; Pereda et al., 2007), changes in protein structure (Hayes et al., 2005; Hayes & Kelly, 2003b), reduction of fat globule size (Pereda et al., 2007; Thiebaud et al., 2003), enhanced rennet coagulation properties in cheese manufacture (Zamora, Ferragut, Jaramillo, Guamis, & Trujillo, 2007) and improvement of quality attributes for yogurt production (less syneresis and higher gel firmness) (Serra, Trujillo, Quevedo, Guamis, & Ferragut, 2007). These results suggest that UHPH is a promising technology that could substitute thermal technologies. However, so far there has been no information related to the volatile profile of UHPH-treated milk.

Knowledge of volatile compounds in UHPH-treated milk will be important to determine the acceptability of the product to the consumer and as a consequence, the possibility of using this technology as an alternative to heat treatments. Therefore, the aim of the present work has been to compare the profile of volatiles during storage at 4 °C in milk submitted to UHPH treatments and that in milk thermally processed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Milk processing

Raw bovine milk ( $3.5 \pm 0.2\%$  fat) was obtained from a local farm (Can Badó, Barcelona, Spain) and was stored overnight at 4 °C.

UHPH of raw milk was performed using a Stansted high-pressure homogenizer (Model/DRG no. FPG 11300:400 Hygienic Homogenizer, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK) with a flow rate of  $140 \text{ L h}^{-1}$ . This equipment consisted of a high-pressure ceramic valve able to withstand 400 MPa and a pneumatic valve, located after the first one, able to withstand up to 40 MPa. The high-pressure system consisted of two intensifiers, which were driven by a hydraulic pump. To minimize temperature retention after treatment, two spiral type heat-exchangers

(Garvía, Barcelona, Spain) were used located behind the second valve. Milk was UHPH-treated at 200 and 300 MPa (single-stage) with inlet temperatures of 30 and 40 °C at each level of pressure. Throughout the experiment, the inlet temperature ( $T_i$ ), the temperature before reaching the first homogenization valve ( $T_1$ ), the temperature before the second homogenization valve ( $T_2$ ), as well as the final temperature of the milk after passing through the heat exchanger ( $T_f$ ) were monitored.

UHPH-treated samples were compared with a high-pasteurized milk (PA). To obtain PA, raw milk was subjected to a two-stage homogenization (18+2 MPa) using a Niro Soavi homogenizer (model X68P, Parma, Italy) and subsequently heat pasteurized using a Finamat heat exchanger (model 6500/010, Gea Finnah GmbH, Ahaus, Germany) at 90 °C for 15 s. Milk samples were collected in amber sterile bottles and stored at 4 °C and, in order to determine the end of shelf-life, treated samples were subjected to microbiological analysis after treatment (day 0) and at 7, 14 and 18 days of storage. On each day of sampling, milk samples were frozen at  $-80 \text{ °C}$  until analyses of volatile compounds were conducted.

The experiment was done on two independent occasions.

The volatile profile of UHPH-treated milk was also compared with those of samples of commercial UHT, in-bottle sterilized and pasteurized milk (high-pasteurized).

### 2.2. Microbiological analysis

To assure that the samples had not suffered spoilage the microbiological quality of treated milk was assessed at each time of sampling by enumerating total bacteria, psychrotrophic bacteria and coliforms as described by Pereda et al. (2007).

### 2.3. Chemical standards

Authentic specimens of pentanal, 3-methylheptane, 4-methylheptane and trans-2-hexenal were purchased from Fluka Chemie (Steinheim, Germany). Hexanal, octanal, nonanal, 4-methyl-2-pentanone, 2-heptanone, dimethyl sulfide (DMS) and 2-butanone were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Toluene was obtained from Panreac (Barcelona, Spain) and acetone was acquired from Carlo Erba Reagenti (Rodano, Italy).

### 2.4. Isolation of volatile compounds

Isolation of volatile compounds was performed using a solid phase micro-extraction (SPME) technique with a 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/Carboxen/PDMS fiber (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). The fiber was preconditioned at 270 °C for 1 h prior to use according to the manufacturer's instructions. A milk sample of 10 mL, 20  $\mu\text{L}$  of internal standard solutions (10 ppm trans-2-hexenal and 10 ppm 4-methyl-2-pentanone) and a micro-stirring bar were placed in a 20 mL glass vial ( $75.5 \times 22.5 \text{ mm}$ , Supelco Inc.) which

was sealed with an aluminum crimp cap provided with a blue faced white silicone septum (Supelco Inc.). The vial was placed for 5 min at 45 °C in a water bath with stirring to allow the sample to reach equilibrium and after this the fiber was inserted into the vial through the septum. The setting on the SPME holder assembly scale was adjusted to 1.5 cm to ensure that the fiber was positioned in the headspace above the sample in the same way from run to run. After 90 min of fiber exposure at 45 °C, the fiber was retracted into the SPME assembly and removed from the vial. The setting on the SPME assembly was set to 3 cm prior to desorb volatile compounds in the gas chromatograph (GC). Between runs the fiber was cleaned for 15 min at 270 °C.

### 2.5. Identification of volatile compounds

Gas chromatographic analysis of volatile compounds adsorbed on to the SPME fiber was carried out on a 60 m × 0.25 mm internal diameter DB-5 capillary column with a film thickness of 1 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The mass spectra of milk volatiles were obtained using an HP 6890 Series II gas chromatograph equipped with an HP 5973 mass selective detector (MSD; Hewlett-Packard Inc., Wilmington, DL, USA). SPME desorption was done at 250 °C for the first 2 min and the injector working in splitless mode. Helium was used as a carrier gas at 1.3 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature, initially held at 35 °C for 8 min, was programmed to 150 °C at a heating rate of 4 °C min<sup>-1</sup>, then was heated to 280 °C at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup>, and finally was held at 280 °C for 5 min.

Initially, the MSD was operated in the full scan mode. Electron impact ionization was used at a voltage of 70 eV, ion source temperature of 230 °C, quadrupole temperature of 150 °C and the transfer line was kept at 280 °C. Mass spectra of different treated samples were obtained with a scan range  $m/z$  35–350. These spectra were used to identify peak compounds by comparison of retention times and mass spectra of eluting compounds with those of the NIST' 98 and Wiley 275 library. Confirmation of the identity of some volatile compounds was achieved by comparing the GC retention times and mass spectra of individual components with those of authentic reference compounds injected under the same operating conditions. The retention time, a characteristic target ion and one or more qualifier ions were selected for each of the compounds identified. Upon selection of ions, the MS was run in selected ion monitoring (SIM) mode. With the aim of improving the sensitivity, six groups of ions were formed (Table 1) and the dwell time of 30 ms was used.

Volatile compounds were expressed as relative area to the area of the *trans*-2-hexenal internal standard.

### 2.6. Statistical analyses

Data were statistically analyzed using the general linear model procedure of Statistical Analysis System software

Table 1

Volatile compounds studied together with the retention time and selected ions

Group	Compound	rt (min) <sup>a</sup>	$m/z$ <sup>b</sup>
1 (0–6 min)	Acetone	5.12	<u>43</u> , 58
	Dimethyl sulphide	5.64	<u>47</u> , <u>62</u>
2 (6–10 min)	Pentane	6.78	<u>43</u> , <u>57</u>
	2-Methyl-1-pentene	7.55	<u>56</u> , 41
	Hexane	7.94	<u>57</u> , 41, 43, 56
	2-Butanone	8.08	<u>43</u> , <u>72</u>
3 (10–18 min)	2-Methylhexane	11.3	<u>43</u> , 57
	3-Methylhexane	11.8	<u>43</u> , <u>57</u> , 71
	2-Pentanone	12.50	<u>43</u> , 86
	Pentanal	13.05	<u>58</u> , 57
	Heptane	13.2	<u>43</u> , <u>57</u> , 71
	2,5-Dimethylhexane	15.02	<u>57</u> , 43, 71
	2,4-Dimethylhexane	15.15	<u>43</u> , <u>57</u>
	4-Methyl-2-pentanone (IS)	15.53	<u>58</u> , 43
	2,3-Dimethylhexane	16.75	<u>43</u> , 71
	2-Methylheptane	17.06	<u>43</u> , <u>57</u>
	4-Methylheptane	17.16	<u>43</u> , <u>71</u>
	Toluene	17.17	<u>91</u> , <u>92</u>
4 (18–27 min)	3-Methylheptane	17.51	<u>57</u>
	Hexanal	18.92	<u>56</u> , 41
	Octene (isomer 1)	19.01	<u>55</u> , 70
	Octene (isomer 2)	19.38	<u>55</u> , 70
	3-Methyl-2-heptene	19.57	<u>55</u> , 70
	Octene (isomer 3)	19.84	<u>55</u> , 70
	2,4-Dimethylheptane	20.26	<u>43</u> , 85
	2,4-Dimethyl-1-heptene	21.33	<u>43</u> , 55
	<i>Trans</i> -2-hexenal (IS)	21.83	<u>55</u>
	Heptanal	24.31	<u>70</u> , <u>43</u> , 55
5 (27–29.5 min)	Hexanoic acid	27.56	<u>60</u> , 73
	Octanal	29.14	<u>43</u> , <u>56</u>
6 (> 29.5 min)	Limonene	30.58	<u>68</u> , <u>93</u>
	3,5-Octadien-2-one	33.48	<u>95</u> , 43
	Nonanal	33.5	<u>57</u> , 41

<sup>a</sup>Retention time.

<sup>b</sup>Selected ions for each analyte for selected ion monitoring (SIM) analysis. Underlined ions were used for peak integration.

(Statistical Analysis Systems Institute, 2004). Data were presented as least square means and the Tukey test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significance level of  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microbiological analysis

Total and psychrotrophic counts of raw milk ranged between 3.5 and 4.0 log(cfu mL<sup>-1</sup>). After treatment, these counts were reduced to 0.2–1 log(cfu mL<sup>-1</sup>) depending on the treatment applied. Counts increased during storage and the end of shelf-life was determined at day 18 (data not shown) when psychrotrophic counts were over the microbiological limit established by the European legal standard ( $n = 5$ ,  $c = 1$ ,  $m = 5 \times 10^4$ ,  $M = 5 \times 10^5$ ) for pasteurized

milk, where  $n$  is the number of sample units comprising the sample,  $m$  is the threshold value for the number of bacteria, and the result is considered satisfactory if the number of bacteria in all sample units does not exceed “ $m$ ”,  $M$  is the maximum value for the number of bacteria, and the result is considered unsatisfactory if the number of bacteria in one or more sample units is “ $M$ ” or more,  $c$  is the number of sample units where the bacteria count may be between  $m$  and  $M$ , the sample being considered acceptable if the bacteria count of the other sample unit is  $m$  or less (European Union, 1992). Coliform counts in raw milk were between 3.2 and 3.5 log(cfu mL<sup>-1</sup>) and were not detected after treatment or during storage.

### 3.2. Temperature increase during UHPH treatment

The milk temperatures measured for the conditions used in this study are shown in Table 2. The increase in temperature during UHPH treatments is a consequence of the adiabatic heating generated in the machine in addition to the high turbulence, shear and cavitation forces that the fluid suffers in the homogenization valve (Hayes & Kelly, 2003b; Thiebaud et al., 2003). As can be seen, treatments performed at 300 MPa at both inlet temperatures were the most intense UHPH treatments, reaching temperatures above that of the high-pasteurization treatment. However, it is important to note that immediately after reaching  $T_2$ , the milk was quickly cooled by passing through a heat exchanger and, accordingly, the holding time at the higher temperature  $T_2$  was very short ( $\leq 0.7$  s).

### 3.3. Identification of volatile compounds

Thirty-three volatile compounds which included ketones, aldehydes, sulfur compounds, fatty acids, terpenes (Table 3) and hydrocarbons were identified in the headspace of milk samples by GC–MS. As in the results of other authors (Mouchili et al., 2005; Solano-López, Ji, & Alvarez, 2006; Valero, Villamiel, Miralles, Sanz, & Martínez-Castro, 2001), methyl ketones and hydrocarbons were the main groups of volatile compounds found in the milk samples. Ketones have different origins: acetone and 2-butanone are thought to be derived from cow feed (Gordon & Morgan, 1973) and

they have been detected in raw milk (Señorans, Tabera, Herraiz, & Reglero, 1996). However, although ketones are naturally present in raw milk, most of them can be formed during heat treatment by  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids followed by decarboxylation (Nawar, 2000) or by decarboxylation of  $\beta$ -ketoacids present in milk fat (Calvo & de la Hoz, 1992). UHPH milk treated at 300 MPa with  $T_i = 40^\circ\text{C}$  and high-pasteurized milk showed the highest values for 2-pentanone, 2-heptanone and 2-nonanone. An increase in methyl ketones with the increase in the severity of heat treatment was observed by Contarini and Povolò (2002) and by Contarini et al. (1997) who suggested that these compounds are associated with the development of stale-heated flavor in UHT milk. During storage an increase ( $P < 0.05$ ) in 2-heptanone and 2-nonanone was observed, according to previous studies on UHT milk which showed that the increase of ketones during storage is dependent upon storage temperature and ketone chain length, being more pronounced as the ketone chain length increases (Contarini et al., 1997; Rerkrai, Jeon, & Bassette, 1987).

Straight-chain-aldehydes are common oxidation products in milk that can result from the auto-oxidation of unsaturated fatty acids and spontaneous decomposition of hydroperoxides promoted by heat (Vazquez-Landaverde et al., 2006a). Pentanal and hexanal can also be present in raw milk (Calvo & de la Hoz, 1992), and can be originated by light-induced lipid oxidation (Kim & Morr, 1996). In the present study, aldehyde content was greater in all UHPH-treated samples (300 > 200 MPa) than in PA milk. Vazquez-Landaverde et al. (2006a) working with high hydrostatic pressure observed the same phenomenon of an increase in aldehyde concentration under high pressure. They suggested that under high pressure oxygen becomes more soluble and hence it could increase the formation of hydroperoxides, leading to more aldehyde formation. However, high hydrostatic pressure and UHPH are different technologies and therefore the mechanisms involved in the formation of volatiles could be different. Studies on milk with high hydrostatic pressure (100–800 MPa for 30 min) showed that the milk fat globules are not disrupted during static high pressure treatment (Ye, Anema, & Singh, 2004). On the contrary, studies of UHPH at pressures from 200 to 300 MPa have shown that the fat globule size in milk samples is drastically reduced after treatment (Pereda et al., 2007). The mechanism of formation of volatiles under high pressure homogenization is not known but probably at higher pressure the milk fat globule membrane (MFGM) is more affected and thus fatty acids are more exposed and furthermore, at 300 MPa, the higher temperature achieved can also promote hydroperoxide formation. During storage a decrease in aldehyde content was observed in all samples. Similar results were published by Contarini et al. (1997) who also observed a decrease in aldehyde content in UHT milk stored at 4 °C and at room temperature. Nevertheless, Rerkrai et al. (1987) reported a general increase in aldehyde content during storage of UHT milk

Table 2  
Temperature changes of milk during ultra-high pressure homogenization treatment

$T_i^a$ (°C)	Homogenization pressure (MPa)	$T_1^b$ (°C)	$T_2^c$ (°C)	$T_f^d$ (°C)
30	200	34.5	78.5	21
	300	38	95.5	22
40	200	42.5	85	22
	300	44	101.5	27

<sup>a</sup> $T_i$  = inlet temperature.

<sup>b</sup> $T_1$  = temperature before the first homogenization valve.

<sup>c</sup> $T_2$  = temperature before the second homogenization valve.

<sup>d</sup> $T_f$  = outlet temperature.



Table 3  
Volatile compounds (relative area to the area of the internal standard) detected in raw, high-pasteurized and UHPH-treated milk samples during storage at 4 °C<sup>a</sup>

Compound	Day	Treatments					
		Raw	200 MPa (30 °C)	200 MPa (40 °C)	300 MPa (30 °C)	300 MPa (40 °C)	Pasteurized (90 °C, 15 s)
<i>Ketones</i>							
Acetone	1	22.67 <sup>a</sup>	25.89 <sup>a</sup>	35.37 <sup>a</sup>	39.40 <sup>a</sup>	40.40 <sup>a</sup>	28.37 <sup>a</sup>
	18		29.21 <sup>a</sup>	22.99 <sup>a</sup>	31.60 <sup>a</sup>	31.80 <sup>a</sup>	36.17 <sup>a</sup>
2-Butanone	1	2.23 <sup>a</sup>	2.47 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>	4.61 <sup>a</sup>	4.01 <sup>a</sup>	2.62 <sup>a</sup>
	18		3.33 <sup>b,c</sup>	2.99 <sup>c</sup>	4.57 <sup>a</sup>	4.19 <sup>a</sup>	3.86 <sup>a,b</sup>
2-Pentanone	1	0.14 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>
	18		0.13 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>
2-Heptanone	1	0.11 <sup>d</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.17 <sup>c</sup>	0.17 <sup>c</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>
	18		0.49 <sup>c</sup>	0.64 <sup>b,c</sup>	0.53 <sup>c</sup>	0.84 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a,b</sup>
3,5-Octadien-2-one	1	0.02 <sup>c</sup>	0.04 <sup>a,b</sup>	0.05 <sup>a,b</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.02 <sup>b</sup>
	18		0.04 <sup>a,b</sup>	0.04 <sup>a,b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.02 <sup>b</sup>
2-Nonanone	1	0.04 <sup>c</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>
	18		0.11 <sup>b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>
<i>Aldehydes</i>							
Pentanal	1	0.02 <sup>c</sup>	0.09 <sup>b,c</sup>	0.12 <sup>b,c</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>
	18		0.07 <sup>b</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
Hexanal	1	0.26 <sup>b</sup>	0.60 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	1.82 <sup>a</sup>	1.88 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>
	18		0.71 <sup>b,c</sup>	0.55 <sup>b,c</sup>	1.21 <sup>a,b</sup>	1.52 <sup>a</sup>	0.26 <sup>c</sup>
Heptanal	1	0.08 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.12 <sup>b</sup>
	18		0.16 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>
Octanal	1	0.02 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.04 <sup>b</sup>
	18		0.04 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>
Nonanal	1	0.16 <sup>a,b</sup>	0.23 <sup>a,b</sup>	0.24 <sup>a,b</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.12 <sup>b</sup>
	18		0.19 <sup>b</sup>	0.22 <sup>a,b</sup>	0.24 <sup>a,b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.13 <sup>c</sup>
<i>Sulphur</i>							
Dimethyl sulphide	1	0.21 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>
	18		0.37 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>
<i>Fatty acids</i>							
Hexanoic acid	1	0.04 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>
	18		0.43 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.02 <sup>b</sup>
<i>Terpenes</i>							
Limonene	1	0.02 <sup>c</sup>	0.18 <sup>b,c</sup>	0.35 <sup>a,b</sup>	0.12 <sup>b,c</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.03 <sup>c</sup>
	18		0.19 <sup>a,b</sup>	0.33 <sup>a,b</sup>	0.17 <sup>a,b</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.04 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Means in the same row followed by different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ). Values are means of duplicate analysis from two independent experiments.

and they attributed this behavior to oxygen availability and storage temperature.

Aliphatic hydrocarbons have been observed in ultra-pasteurized milk (i.e., heat treatment higher than pasteurization but lower than UHT process) (Solano-López et al., 2006), pasteurized and fermented milk (Imhof & Bosset, 1994) and raw milk (Toso, Procida, & Stefanon, 2002), although the origin of these hydrocarbons is not well-understood. With the treatment conditions used in the present study, the following 19 hydrocarbons were detected: pentane, 2-methyl-1-pentene, hexane, 2-methylhexane, 3-methylhexane, 2,5-dimethylhexane, 2,4-dimethylhexane, 2,3-dimethylhexane, heptane, 2-methylheptane, 3-methylheptane, 4-methylheptane, 2,4-dimethylheptane, 3-methyl-2-heptene, 2,4-dimethyl-1-heptene and three different octene isomers. Only one hydrocarbon (2-methyl-1-pentene) presented significant differences ( $P < 0.05$ ) between raw (relative

area of 0.9) and treated samples (relative area of ~0.3). Therefore, we could suppose that hydrocarbon content in milk is not related to the treatment applied and it could well be associated to the type of feed. Toluene was the only aromatic hydrocarbon identified in this study which, in raw milk, may originate from the breakdown of  $\beta$ -carotene (Contarini et al., 1997).

Significant differences in limonene content were found between milk samples. However, no references have been found available in the literature on the influence of heat treatment on the formation of terpenes. Limonene has been described by Contarini et al. (1997) in pasteurized, UHT and in-bottle sterilized milk and by Solano-López et al. (2006) in ultrapasteurized milk. Limonene is the predominant terpene hydrocarbon identified in milk and it comes from the plants used in cow feed, particularly from mixtures of dycotyledonous plants, although some



microorganisms can also synthesize terpenes (Bendall, 2001; Toso et al., 2002).

It has been reported that sulfur compounds such as hydrogen sulfide, methanethiol, carbon disulfide, DMS, dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide liberated by heat from the exposed sulfhydryl groups of whey proteins, primarily  $\beta$ -lactoglobulin, are responsible for the cooked flavor of heated milk (Christensen & Reineccius, 1992; Patrick & Swaisgood, 1976; Simon & Hansen, 2001). Only DMS was detected in our study, probably owing to the mass spectrometric detectors or the SPME technique being insufficiently sensitive to allow the analysis of sulfur compounds at the low levels of concentration produced. The widely used flame-ionization detector (FID) and the flame photometric detector (FPD) are not sufficiently sensitive for the detection of most sulfur compounds present in milk (Vazquez-Landaverde et al., 2005). Recently, the pulsed flame photometric detector (PFPD), has started to be used for sulfur compounds (Vazquez-Landaverde, Torres, & Qian, 2006b). Recent work by Havemose, Justesen, Bredie, and Nielsen (2007) demonstrated that SPME is an appropriate method to study oxidative changes in milk but that it is not sensitive enough to detect compounds present at low concentrations, such as sulfur compounds. In our study, the SPME technique was used to analyze volatile compounds because the effect of high-pressure homogenization on milk fat globules will produce more oxidative than thermal changes. The presence of DMS in raw milk can be a consequence of cow feed while in heated milk it can be formed from methionine (Calvo & de la Hoz, 1992). No significant differences in DMS were detected between raw and treated milk samples, although the content of DMS was lowest in raw milk. DMS has a very low threshold of olfactory perception and very small differences in concentration could change milk aroma (Gordon & Morgan, 1973). Therefore, the lack of significant differences in analytical results between treated milk and raw milk cannot necessarily be interpreted to mean that there is an insignificant contribution to the sensory perception of off-flavors.

Free fatty acids of short chain length are produced by degradation of milk triglycerides, generating rancid flavors. Of these, using the DVB/Carboxen/PDMS fiber, only hexanoic acid was detected. Free fatty acids are less volatile than other compounds such as aldehydes and ketones and temperature used to extract volatile compounds (45 °C) was probably not the optimum for extraction of fatty acids. In a study using freshly pasteurized homogenized milk, different fibers and temperatures, Gonzalez-Cordova and Vallejo-Cordoba (2001) concluded that polyacrylate fiber and a temperature of 70 °C were adequate to extract free fatty acids from milk samples by SPME. During storage at 4 °C, hexanoic acid content increased in milk samples treated at 200 MPa at  $T_1 = 30$  and 40 °C. Probably, at this pressure, temperatures achieved after the first valve ( $T_2$ ) were not high enough to inactivate milk lipoprotein lipase

completely. In consequence of the damage to the MFGM and the reduction of fat globule size after treatment, this enzyme could easily gain access to the fat and could find greater interfacial fat surface area on which to act, generating lipolysis in the milk. Studies of free fatty acids by GC that are being carried out in our laboratories suggest that milk samples treated at 200 MPa suffer lipolysis during storage while those treated at 300 MPa are not affected (results not shown).

As mentioned in Section 1, investigations into new technologies are intended to show that it is possible to produce milk with a microbial shelf-life similar to that of UHT milk without compromising its flavor. For this reason, the volatile profile of UHPH treated milk was also compared with commercial UHT, in-bottle sterilized and high-pasteurized milk. Although these commercially processed samples were not obtained from the same source of raw milk used for the experiments on UHPH and PA milk, they gave us a relative comparison between the UHPH treatments and commercial thermal processes. Typical chromatograms of these samples can be seen in Fig. 1. Because of the scale of the chromatogram, only major compounds can be seen. Major differences between milk samples were observed in methyl ketone values. A marked increase, correlated with the severity of heat treatment, was observed for 2-pentanone, 2-heptanone and 2-nonanone. Hexanal content remained almost the same for all these samples thus indicating that the aldehyde content was affected by heat processing to a lesser extent than that of the ketones. The lower levels of ketones (compounds induced by heat treatment) in UHPH-treated samples compared to those of UHT and in-bottle sterilized milk samples, suggest that UHPH could be a promising technology since it is probable that less thermal damage is generated in milk. However, further studies are required to evaluate the nutritional properties, losses of vitamins, consumer acceptability and the heat load that milk receives after UHPH treatments. Different indicators such as lactulose, furosine and denatured whey proteins (Elliot, Datta, Amenu, & Deeth, 2005), will be used to evaluate the changes induced in milk by heat processing.

#### 4. Conclusion

The SPME technique performed in the present study using a DVB/Carboxen/PDMS fiber allowed us to identify a large number of important flavor and volatile compounds present in milk. The profile of volatile compounds included the presence of aldehydes, ketones, hydrocarbons and other analytes such as hexanoic acid, limonene and DMS.

The lower treatment temperature achieved at 200 MPa (~85 °C) compared with the temperatures of high-pasteurization (90 °C) and 300 MPa (~100 °C) treatments, resulted in milk with lower ketone content whereas hexanoic acid content increased, suggesting possible lipolysis. Ketone and aldehyde levels of UHPH-treated samples at 300 MPa at both  $T_1$  were higher compared with PA and 200 MPa

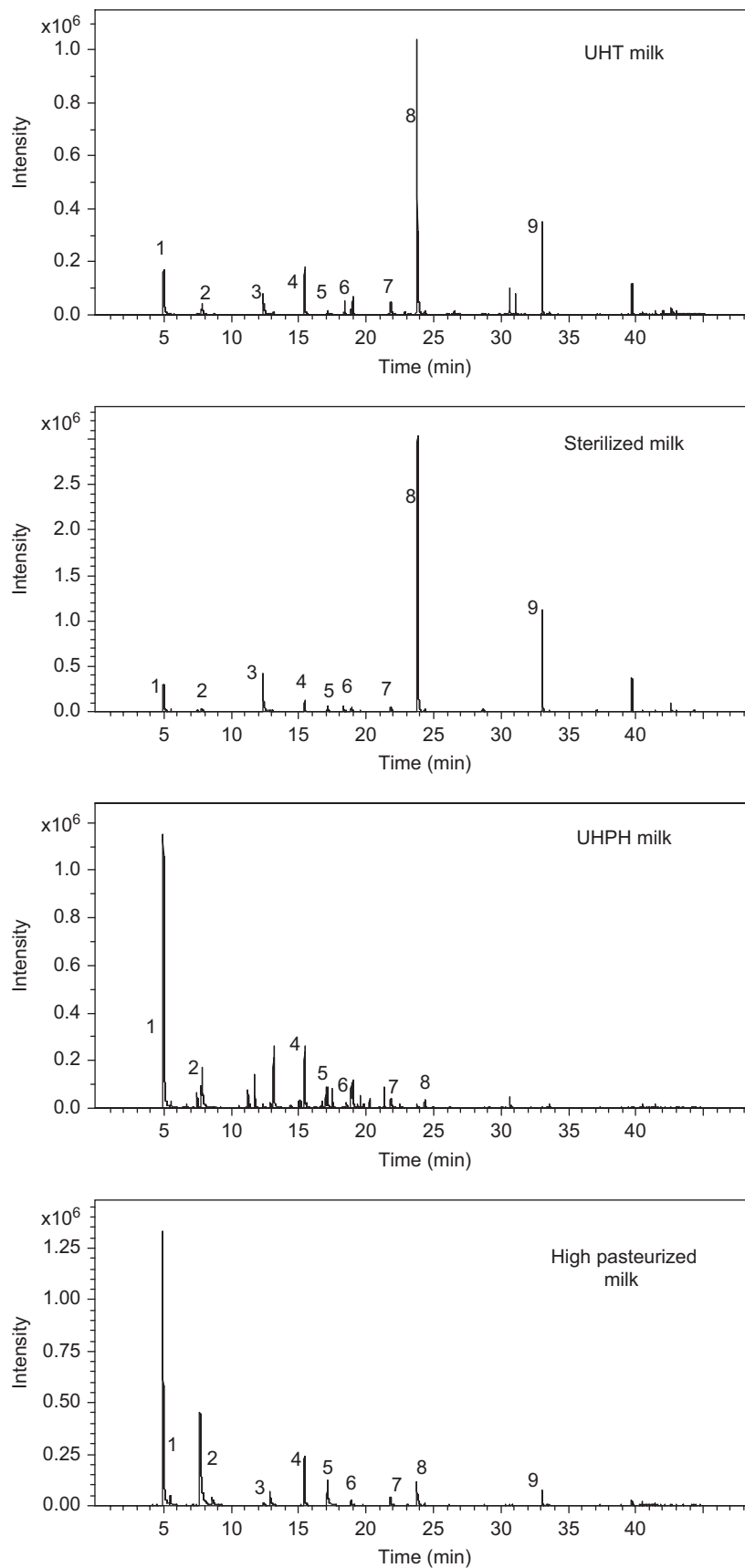


Fig. 1. Typical chromatograms obtained by GC–MS of different commercial and UHPH (300 MPa 40 °C) milk samples; peaks are: acetone (1), 2-butanone (2), 2-pentanone (3), IS1 = 4-methyl-2-pentanone (4), toluene (5), hexanal (6), IS2 = *trans*-2-hexenal (7), 2-heptanone (8) and 2-nonanone (9).

UHPH-treated milk types, but lower compared with commercial UHT, pasteurized and in-bottle sterilized milk samples. In commercial milk samples, heat treatment resulted in the formation of both aldehydes and ketones, whereas with UHPH treatment only aldehydes were formed. The formation of DMS (a thermally derived compound) did not show differences between UHPH and heat-treated milk samples. Present results indicate that formation of volatile compounds related to heat and oxidized off-flavors detected by SPME was less in UHPH-treated samples compared to commercial milk types. UHPH therefore seems to be a good alternative to traditional heat treatments.

Further studies will be necessary to understand the mechanism of formation of volatile compounds under high-pressure homogenization.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the European Union for this investigation (CRAFT project 512626), and Julieta Pereda acknowledges a predoctoral fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). Moreover, we wish to thank A. Eustaquio and M.J. Ibarz for their assistance in chromatography analysis.

### References

- Bendall, J. G. (2001). Aroma compounds of fresh milk from New Zealand cows fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4825–4832.
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., & Guamis, B. (2006). Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation. *Lait*, *86*, 241–249.
- Calvo, M. M., & de la Hoz, L. (1992). Flavour of heated milks. A review. *International Dairy Journal*, *2*, 69–81.
- Christensen, K. R., & Reineccius, G. A. (1992). Gas chromatographic analysis of volatile sulfur compounds from heated milk using static headspace sampling. *Journal of Dairy Science*, *75*, 2098–2104.
- Contarini, G., & Povo, M. (2002). Volatile fraction of milk: Comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 7350–7355.
- Contarini, G., Povo, M., Leardi, R., & Toppino, P. M. (1997). Influence of Heat treatment on the volatile compounds of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3171–3177.
- Elliot, A. J., Datta, N., Amenu, B., & Deeth, H. C. (2005). Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *Journal of Dairy Research*, *72*, 442–446.
- Elwell, M. W., & Barbano, D. M. (2006). Use of microfiltration to improve fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, *89*, E10–E30.
- European Union. (1992). European Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992. Laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. *Official Journal*, *L268*, 1–32.
- Gonzalez-Cordova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2001). Quantitative determination of short chain free fatty acids in milk using solid phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4603–4608.
- Gordon, D. T., & Morgan, M. E. (1973). Principal volatile compounds in feed flavored milk. *Journal of Dairy Science*, *55*, 905–912.
- Havemose, M. S., Justesen, P., Bredie, W. L. P., & Nielsen, J. H. (2007). Measurement of volatile oxidation products from milk using solvent-assisted flavour evaporation and solid phase microextraction. *International Dairy Journal*, *17*, 746–752.
- Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, *72*, 25–33.
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003a). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, *70*, 307–313.
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003b). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, *70*, 297–305.
- Imhof, R., & Bosset, J. O. (1994). Quantitative GC–MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, *27*, 265–269.
- Kim, Y. D., & Morr, C. V. (1996). Dynamic headspace analysis of light activated flavor in milk. *International Dairy Journal*, *6*, 185–193.
- Mouchili, A., Wichtel, J. J., Bosset, J. O., Dohoo, I. R., Imhof, M., Altieri, D., et al. (2005). HS-SPME gas chromatographic characterization of volatile compounds in milk tainted with off flavour. *International Dairy Journal*, *15*, 1203–1215.
- Nawar, W. W. (2000). Lipidos. In O. W. Fennema (Ed.), *Química De Los Alimentos* (pp. 269–381). Zaragoza, Spain: Ed Acribia.
- Patrick, P. S., & Swaisgood, H. E. (1976). Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high-temperature heating and subsequent storage. *Journal of Dairy Science*, *59*, 594–600.
- Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. (2006). Effect of ultra high-pressure homogenisation on natural-occurring micro-organisms in bovine milk. *Milchwissenschaft*, *61*, 245–248.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, *90*, 1081–1093.
- Rerkrai, S., Jeon, I. J., & Bassette, R. (1987). Effect of various direct ultra-high temperature heat treatments on flavor of commercially prepared milks. *Journal of Dairy Science*, *70*, 2046–2054.
- Rysstad, G., & Kolstad, J. (2006). Extended shelf life milk—advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, *59*, 85–96.
- Señorans, F. J., Tabera, J., Herraiz, M., & Reglero, G. (1996). A method for the direct isolation and gas chromatographic analysis of milk flavor components using a programmed temperature vaporizer. *Journal of Dairy Science*, *79*, 1706–1712.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*, *17*, 782–790.
- Simon, M., & Hansen, A. P. (2001). Effect of various dairy packaging on the shelf life and flavor of ultrapasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, *84*, 784–791.
- Solano-López, C. E., Ji, T., & Alvarez, V. B. (2006). Volatile compounds and chemical changes in ultrapasteurized milk packaged in polyethylene terephthalate containers. *Journal of Food Science*, *70*, 407–412.
- Statistical Analysis Systems Institute. (2004). *User's guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. (versión 9.1.3).
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, *13*, 427–439.
- Toso, B., Procida, G., & Stefanon, B. (2002). Determination of volatile compounds in cows milk using headspace GC–MS. *Journal of Dairy Research*, *69*, 569–577.
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, *72*, 51–58.

- Vazquez-Landaverde, P. A., Torres, J. A., & Qian, M. C. (2006a). Effect of high-pressure-moderate temperature processing on the volatile profile of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 9184–9192.
- Vazquez-Landaverde, P. A., Torres, J. A., & Qian, M. C. (2006b). Quantification of trace volatile sulfur compounds in milk by solid phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Dairy Science*, *89*, 2919–2927.
- Vazquez-Landaverde, P. A., Velazquez, G., Torres, J. A., & Qian, M. C. (2005). Quantitative determination of thermally derived off flavor compounds in milk using solid phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, *88*, 3764–3772.
- Ye, A., Anema, S. G., & Singh, H. (2004). High-pressure-induced interactions between milk fat globule membrane proteins and skim milk proteins in whole milk. *Journal of Dairy Science*, *87*, 4013–4022.
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Trujillo, A. (2007). Effects of ultra high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, *90*, 13–23.



## *Artículo 4*

### **3.4 PROTEOLYSIS OF ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENISED TREATED MILK DURING REFRIGERATED STORAGE.**

Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., Trujillo, A.  
*Food Chemistry*, vol 111, pp. 696-702. (2008).





## Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage

J. Pereda, V. Ferragut, M. Buffa, B. Guamis, A.J. Trujillo\*

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XaRTA, XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 January 2008

Received in revised form 13 February 2008

Accepted 15 April 2008

#### Keywords:

Ultra-high pressure homogenisation  
Proteolysis  
Milk proteins

### ABSTRACT

Plasmin residual activity and its relation to proteolysis of milk subjected to ultra-high pressure homogenisation (UHPH; 200–300 MPa, inlet temperature = 30 °C and 40 °C) and to a high-pasteurisation treatment (90 °C, 15 s) were studied during refrigerated storage. Proteolysis was examined by capillary electrophoresis, HPLC peptide profiles, pH 4.6-soluble nitrogen and free amino acids. Inactivation of plasmin increased as homogenisation pressure did. Extensive proteolysis, was observed in 200 MPa 40 °C milk, due to its higher native and microbial enzyme contents, compared with the other samples. In general, hydrolysis of  $\beta$ -casein, hydrophobic peptide and pH 4.6-soluble nitrogen levels increased with higher residual plasmin activity, while hydrophilic peptides were not affected by the different treatments applied.  $\beta$ -Lactoglobulin was denatured to a greater extent by thermal treatment than by UHPH treatments. This study provides further insight into how UHPH treatments influence milk properties.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Proteolysis in milk products can have positive or negative effects, depending on the reason for processing. Proteolysis can produce desirable flavours and texture during cheese ripening (Farkye & Fox, 1992), while uncontrolled proteolysis can alter the rennet coagulation properties of milk, leading to poor curd formation (Srinivasan & Lucey, 2002), development of bitter flavours, increase in viscosity, and gelation of heated milks (Datta & Deeth, 2003; Kohlmann, Nielsen, & Ladisch, 1991). The rate and extent of proteolysis will be determined by the types and activities of the proteolytic enzymes present. Breakdown of proteins in milk can be mainly caused by indigenous proteases and by those produced by psychrotrophic bacteria during cold storage of raw milk. Plasmin (EC 3.4.21.7), the principal indigenous milk proteinase, has optimum activity at 37 °C and pH 7.4 and hydrolyses mainly  $\beta$ - and  $\alpha_{s2}$ -caseins, and more slowly  $\alpha_{s1}$ -casein (Bastian & Brown, 1996). Plasmin (PL) is part of a complex system called the PL system which includes its active form PL as well as its enzymatically inactive precursor, plasminogen (PG), plasminogen activators, plasminogen activator inhibitors and plasmin inhibitors.

The kinetic behaviour of PL has been studied by several authors and most of them have described a first-order inactivation profile (Kennedy & Kelly, 1997; Saint Denis, Humbert, & Gaillard, 2001). Metwalli, de Jongh, and van Boekel (1998) observed that irrevers-

ible inactivation of the enzyme starts at temperatures above 65 °C. However, there appears to be a strong interference with sulfhydryl groups, since in the absence of SH-components, PL and PG are reported to be very heat-stable (Bastian et al., 1996).

Normally, psychrotrophic bacteria would not be a serious problem in heat treated milk, because they can be eliminated with the thermal treatment applied. Nevertheless, most proteinases from psychrotrophic microorganisms survive UHT treatment and are readily able to degrade  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins, causing proteolysis by themselves (Sorhaug & Stepaniak, 1997), and furthermore these heat-stable proteases can affect the PL system.

Ultra-high pressure homogenisation (UHPH), which is based on the same principle as conventional homogenisation, but works at higher pressures (up to 400 MPa), is being studied as an alternative technology to thermal treatments, with possible applications in milk (Pereda, Ferragut, Quevedo, Guamis, & Trujillo, 2007), cheese (Zamora, Ferragut, Jaramillo, Guamis, & Trujillo, 2007) and yogurt (Serra, Trujillo, Quevedo, Guamis, & Ferragut, 2007) production. UHPH technology at 200 and 300 MPa is able to produce milk with a microbial and physico-chemical shelf-life similar to that of high-pasteurised milk (Pereda et al., 2007). However, the interest in this technology is not only due to its effect on microorganism inactivation, but also due to its alteration of food constituents. Different studies on milk have shown that UHPH reduces the fat globule size (Hayes & Kelly, 2003b; Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud, & Chef-tel, 2003), denaturates whey proteins, with  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) being more affected than  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) (Hayes, Fox, & Kelly, 2005; Zamora et al., 2007), and inactivates indigenous milk

\* Corresponding author. Tel.: +34 935813292; fax: +34 935812006.  
E-mail address: [Toni.Trujillo@uab.es](mailto:Toni.Trujillo@uab.es) (A.J. Trujillo).



enzymes, depending on the pressure applied. Inactivation of PL and PG-derived activities has been observed in conventionally homogenised samples; however, by using high pressure homogenisation more inactivation is produced (Hayes & Kelly, 2003a; Hayes et al., 2005).

The objective of the present study was to investigate and compare the effects of UHPH at 200 and 300 MPa on PL activity and its influence on milk proteolysis with the effects produced by a conventional high-pasteurisation treatment, in order to evaluate the potential application of this emerging technology in the milk industry.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Milk supply

Fresh raw bovine milk ( $11.6 \pm 1.0\%$  total solids and  $3.29 \pm 0.03\%$  protein) was collected from a local farm (Can Badó, Barcelona, Spain), and after fat standardisation at  $3.5 \pm 0.2\%$ , it was kept overnight at  $4^\circ\text{C}$ .

### 2.2. Ultra-high pressure homogenisation and heat-pasteurisation of milk

Milk was subjected to UHPH treatments at 200 and 300 MPa, with inlet temperatures of 30 and  $40^\circ\text{C}$  by using a Stansted high-pressure homogeniser (model FPG11300, Stansted Fluid Power Ltd., Stansted, Essex, UK) which is able to operate at up to 400 MPa and works with a flow rate of 120 l/h. The inlet temperatures of milk were reached by passing milk through a heat exchanger located behind the feeding tank. During UHPH treatments an increase in milk temperature ( $\sim 19^\circ\text{C}$  per 100 MPa) is produced as a consequence of the adiabatic heating generated in the machine, in addition to the high turbulence, shear and cavitation forces that the fluid suffers in the homogenisation valve. Therefore, to minimise temperature retention after treatment, two spiral type heat-exchangers (Garvía, Barcelona, Spain) located behind the second valve were used, which were able to cool milk in less than 0.7 s. During treatments, the inlet temperature ( $T_i$ ), the temperature before the first homogenisation valve ( $T_1$ ), the temperature before the second homogenisation valve ( $T_2$ ), as well as the final temperature of the milk after passing through the heat exchanger ( $T_f$ ), were monitored.

Ultra-high pressure-treated samples were compared with a high-pasteurised milk (PA). Two-stage homogenisation (18 MPa plus 2 MPa) and pasteurisation ( $90^\circ\text{C}$  for 15 s) of raw milk were carried out with a Niro Soavi homogeniser (model X68P, Parma, Italy) and a Finamat heat exchanger (model 6500/010, Gea Finnah GmbH, Ahaus, Germany), respectively.

Milk samples were collected and then stored at  $4^\circ\text{C}$ . Analyses of treated samples were conducted after treatment and at different days during storage (7, 14, 18 and 21 days).

### 2.3. Residual plasmin and plasminogen activities

Sample preparation to determine residual PL and PG activities was performed according to the method described by Richardson and Pearce (1981), with minor changes. Milk samples were diluted with sodium citrate solution (0.4 M) in a 3:1 ratio (milk:citrate), and centrifuged at 27,000g for 15 min at  $25^\circ\text{C}$ . The supernatant solution containing the PL content was centrifuged twice at 15,000g for 15 min in a microcentrifuge.

Plasmin and plasminogen activities were measured using a version of the colorimetric method described by Baldi et al. (1996), using a microplate assay. Plasmin activity was assayed by mixing

250  $\mu\text{l}$  of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), containing 0.6 mM Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilide (Sigma, St. Louis, MO) with 30  $\mu\text{l}$  of the milk supernatant. In the case of PG-derived activity (that is the PL activity generated after addition of urokinase), 100  $\mu\text{l}$  of milk supernatant and 5  $\mu\text{l}$  of urokinase (Sigma) solution (4.35 mg urokinase/ml) were previously incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , prior to assaying total PL activity.

The reaction mixtures were incubated at  $37^\circ\text{C}$  and absorbance was measured at 405 nm at 15 min intervals for 4 h. The absorbance was followed in a microprocessor controlled reader (SLT-Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria) equipped with a thermostatted cell holder and 96-well microtitre plates. A sample without supernatant served as a control for the detection of spontaneous breakdown of the substrate. Plasmin and plasminogen activities were expressed as units: 1 unit of PL being the amount of enzyme that produced a change in absorbance at 405 nm of 0.1 in 60 min. Measurements were carried out in triplicate.

### 2.4. Separation of milk fractions

The pH 4.6-insoluble fraction containing the isoelectric caseins was prepared by precipitation of milk with 1 M sodium acetate buffer (pH 4.6) followed by centrifugation at 4500g and  $5^\circ\text{C}$  for 15 min. The casein pellets recovered were first washed three times with 1 M sodium acetate buffer (pH 4.6) and then, to remove the remaining fat, they were washed twice with a mixture of sodium acetate buffer/dichloromethane (1:1, v/v). The final protein precipitate was then lyophilised. The pH 4.6-soluble fraction was filtered through Whatman No. 1 paper and kept frozen until used. From this fraction the pH 4.6-soluble nitrogen (pH 4.6-SN) was determined by the Dumas method (IDF, 2002), and total free amino acids (FAA) by the cadmium-ninhydrin method of Folkertsma and Fox (1992). These determinations were done in triplicate.

### 2.5. Capillary electrophoresis

Analysis of individual proteins in the pH 4.6-insoluble fraction was performed by capillary electrophoresis (CE) by using an Agilent CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) controlled by Chemstation software (Agilent). The electrophoresis conditions and sample buffers were similar to those used in the method described by Recio and Olieman (1996), using a fused silica capillary column (BGB Analytik, Essen, Germany) of  $0.6\text{ m} \times 50\ \mu\text{m}$  i.d. with an effective length of 50 cm. Electrophoresis runs were done at  $45^\circ\text{C}$  with a linear voltage gradient from 0 to 20 kV in 3 min, followed by a constant voltage of 20 kV. Detection of proteins was at 214 nm and identification of peaks was carried out by comparison with capillary electrophoregrams obtained elsewhere (Recio, Pérez-Rodríguez, Ramos, & Amigo, 1997). The extent of breakdown of caseins was expressed as a relative percentage of peak areas of raw milk analysed on the first day of storage, and as a percentage of the respective area at day 1, for samples analysed during storage. All samples were analysed in duplicate.

### 2.6. HPLC peptide analysis

Peptides in the pH 4.6-soluble fraction were analysed in triplicate by reversed-phase (RP)-HPLC with a Summit  $\times 2$  dual gradient HPLC system (Dionex, Idstein, Germany). Samples (50  $\mu\text{l}$ ) previously filtered through a  $0.45\ \mu\text{m}$  filter were injected into a  $\text{C}_{18}$ -bonded silica gel ( $250 \times 4.6\text{ mm}$ ) with a particle diameter of 5  $\mu\text{m}$  and pore width of 3000 nm (Symmetry 300, Waters), at a constant temperature of  $40^\circ\text{C}$ . Peptides were eluted using a binary gradient program at a flow rate of 1 ml/min. Eluent A was 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma) in Milli-Q water and eluent B was 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile (Panreac, Barcelona, Spain). The

linear gradient, expressed as solvent A, was 100% at 0 min, 97% at 3 min, 50% at 60 min and 0% at 65 min. Detection was performed at 220 nm. After each run, the integration area of peptides, excluding that of FAA and whey proteins, was determined. The area of peptides between 3.5 and 20 min (between Tyr and Trp) was considered the hydrophilic peptide portion while the area of peptides eluting after 20 min was considered the hydrophobic peptide portion. The amount of hydrophobic and hydrophilic peptides were expressed as units of chromatogram peak area.

### 2.7. Accelerated test of proteolysis

Proteolysis in milk was estimated after incubation of milk samples for 48 h at 37 °C in the presence of 0.07% NaN<sub>3</sub> (Sigma) as inhibitor of bacterial growth. The proteolytic activity was calculated as the percent increase in pH 4.6-SN (obtained as above) after incubation, and it was also estimated by analysing the peptide pattern as explained above.

### 2.8. Statistical analysis

Results were analysed by an analysis of variance, using the general linear models procedure of the (Statistical Analysis Systems Institute, 2004). The Student–Newman–Keuls test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significant level of  $p < 0.05$ . Correlations between caseins, peptides, FAA and pH 4.6-SN were evaluated with Pearson's test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Residual plasmin and plasminogen activities

Plasmin and plasminogen activities decreased in treated samples, compared to raw milk, and PL was significantly affected by UHPH and PA treatments (Table 1). Data of PG showed that most of the potential PL activity in raw milk is in the form of the inactive precursor PG, which is then converted to active PL. PG-derived activity demonstrated a greater sensitivity to the treatments applied than PL. However, decreases in PG-derived activity do not necessarily mean PG inactivation. An increase in activity of PL and a subsequent decrease in concentration of PG were observed in pasteurised milk, compared to raw milk, after incubation at 37 °C for 48 h (Richardson, 1983). Prado, Sombers, Ismail, and Hayes (2006) observed that PG activator inhibitors are less heat-stable than PL inhibitor, which indicated that activation of PG could overcome any inhibition of PL. This implies that these large amounts of PG in raw milk should be taken into account because

**Table 1**  
Plasmin and plasminogen-derived activities (U/ml) for raw and treated milk samples<sup>A</sup> together with the temperature changes of milk during ultra-high pressure homogenisation treatment

Treatment	T <sub>1</sub> <sup>B</sup> (°C)	T <sub>2</sub> <sup>C</sup> (°C)	Plasmin	Plasminogen
Raw milk			5.70 <sup>a</sup> ± 0.00	20.91 <sup>a</sup> ± 5.38
200 MPa 30 °C	34.5	78.5	3.17 <sup>b</sup> ± 1.10	0.63 <sup>b</sup> ± 1.10
200 MPa 40 °C	42.5	85	3.17 <sup>b</sup> ± 1.10	1.90 <sup>b</sup> ± 1.90
300 MPa 30 °C	38	95.5	1.43 <sup>c</sup> ± 0.59	0.29 <sup>b</sup> ± 0.80
300 MPa 40 °C	44	101.5	1.90 <sup>c</sup> ± 0.00	2.85 <sup>b</sup> ± 1.10
Pasteurised <sup>D</sup>			1.43 <sup>c</sup> ± 0.36	0.06 <sup>b</sup> ± 0.29

<sup>a,b,c</sup>Different superscripts indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>A</sup> Data are means ± standard deviations of triplicate analysis from three independent experiments.

<sup>B</sup> T<sub>1</sub>: temperature before the first homogenisation valve.

<sup>C</sup> T<sub>2</sub>: temperature before the second homogenisation valve.

<sup>D</sup> Pasteurised: high-pasteurised milk (90 °C for 15 s).

the simple activation of a fraction of this PG would lead to a significant increase of the proteolytic activity.

Approximately 70% of the PL activity in raw milk was inactivated by UHPH at 300 MPa and PA treatments, and 45% at 200 MPa. Hayes et al. (2005) also obtained a 70% inactivation in conventional pasteurised milk, and 85 and 95% inactivation at 150 and 250 MPa (T<sub>i</sub> = 45 °C), respectively. In another study, Hayes and Kelly (2003a) working with the same machine, but at a lower inlet temperature, observed lower PL inactivation (65%). They suggested that inactivation of PL must be due to the temperature achieved combined with the forces that the fluid suffers in the high pressure valve. Inactivation of PL by UHPH has also been studied by Datta, Hayes, Deeth, and Kelly (2005), who working at 200 MPa and T<sub>i</sub> = 25 °C and 50 °C, obtained 74% and 90% inactivation, respectively. In the present study, a higher temperature was achieved during processing (see Table 1), compared to those achieved in the previously mentioned works; however, lower PL inactivation was observed. Differences in PL inactivation between this study and the other works could be explained by a combination of differences in the valve construction and machine design, as well as in the inlet temperature and the time at which milk is maintained at the highest temperature reached during the UHPH treatment. In our study milk was quickly cooled; therefore, the holding time at the highest temperature was very short and probably inactivation of PL was mainly produced by the mechanical forces associated with this treatment. Datta et al. (2005) observed enzyme inactivation at temperatures lower than those needed for thermal inactivation and therefore they confirmed that in UHPH, mechanical forces are more important in PL inactivation than the thermal effect. Additionally, PL is relatively instable in the presence of whey proteins, in particular β-Lg, which plays a major role in the thermal inactivation of PL in milk. During thermal denaturation, β-Lg exposes its free sulphhydryl groups which can form a complex with the unfolded enzyme, via disulphide/sulphhydryl interactions, leading to irreversible denaturation of PL (Metwalli et al., 1998). In the present study β-Lg was most denatured by the high-pasteurisation treatment, followed by UHPH treatments at 300 MPa and both T<sub>i</sub>, and by 200 MPa and T<sub>i</sub> = 40 °C (Table 2).

Both PL and PG were susceptible to inactivation by UHPH treatments. However, since UHPH is a new technology and PL system in milk is quite complex, it is difficult to know the exact nature of their inactivation.

### 3.2. pH 4.6-Insoluble fraction

A typical electropherogram showing the separation of milk proteins from pH 4.6-insoluble fraction is shown in Fig. 1. The relative migration of the proteins was in accordance with previous reports (De Noni, Pellegrino, Cattaneo, & Resmini, 2007; García-Risco, Ramos, & López-Fandiño, 1999; Recio et al., 1997). The peak belonging to β-Lg was found in all treated samples studied, whereas the presence of α-La was almost negligible, indicating that β-Lg is more susceptible than α-La to heat and pressure homogenisation denaturation. This is in accordance with the results presented by Zamora et al. (2007), where 35% of denaturation was observed for β-Lg and 12% for α-La in cheese whey from milk treated at 300 MPa. As can be seen in Table 2, immediately after processing, there were higher levels of β-Lg in the casein fraction of PA milk than in those of UHPH-treated samples, demonstrating that β-Lg was more drastically denatured by the conditions used in the thermal treatment than by pressure homogenisation. During refrigerated storage, an increase in the amount of peaks in the area of β-Lg was observed; these whey protein peaks were not analyzed during storage, because probably some protein peaks could co-migrate at the same time as β-Lg, complicating the determination of whey protein changes during storage. In this sense, García-Risco

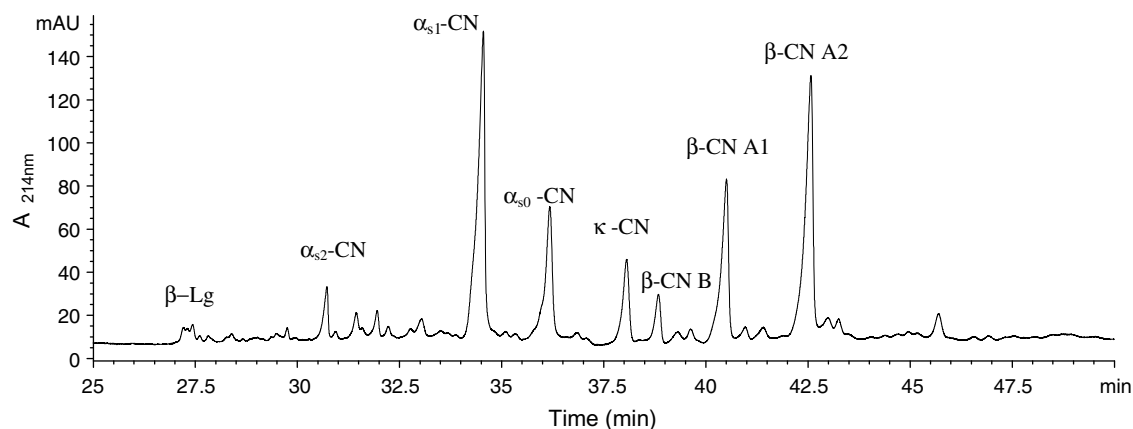
**Table 2**

Mean values  $\pm$  standard deviation of residual  $\beta$ -lactoglobulin (peak area units) and caseins, expressed as a percentage of peak areas of raw milk, for samples analysed the first day of storage, and as a percentage of the respective area at day 1, for samples analysed at day 21 of storage at 4 °C

	Treatment					
	Day	200 MPa, 30 °C	300 MPa, 30 °C	200 MPa, 40 °C	300 MPa, 40 °C	Pasteurised <sup>A</sup>
$\alpha_{s2}$ -Casein (%)	1	73.7 $\pm$ 8.3	80.8 $\pm$ 12.7	76.7 $\pm$ 18.2	64.4 $\pm$ 3.4	84.1 $\pm$ 17.1
	21	53.8 <sup>c</sup> $\pm$ 6.7	48.2 <sup>c</sup> $\pm$ 16.1	45.8 <sup>c</sup> $\pm$ 7.8	72.1 <sup>b</sup> $\pm$ 4.3	94.4 <sup>a</sup> $\pm$ 11.2
$\alpha_{s1}$ -Casein (%)	1	61.4 $\pm$ 6.6	61.1 $\pm$ 15.3	61.9 $\pm$ 2.8	57.1 $\pm$ 9.9	69.9 $\pm$ 6.2
	21	93.9 <sup>ab</sup> $\pm$ 7.4	78.5 <sup>b</sup> $\pm$ 6	83.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 16.8	82.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 2	98.4 <sup>a</sup> $\pm$ 15
$\kappa$ -Casein (%)	1	63.1 $\pm$ 5.7	64.1 $\pm$ 16.2	65.5 $\pm$ 6.6	56.1 $\pm$ 14.5	70.1 $\pm$ 4.8
	21	106 <sup>a</sup> $\pm$ 12.4	96.7 <sup>a</sup> $\pm$ 15.9	63.4 <sup>b</sup> $\pm$ 2.8	101 <sup>a</sup> $\pm$ 4.5	114 <sup>a</sup> $\pm$ 26.7
$\beta$ -Casein (%)	1	55.8 $\pm$ 9.9	65.8 $\pm$ 9	63.8 $\pm$ 6	58.8 $\pm$ 10.1	67 $\pm$ 6.9
	21	63.5 <sup>b</sup> $\pm$ 5.5	66.8 <sup>b</sup> $\pm$ 3.2	47.4 <sup>c</sup> $\pm$ 18.1	81.7 <sup>b</sup> $\pm$ 2	97.2 <sup>a</sup> $\pm$ 17
$\beta$ -Lg (Peak area units)	1	128 <sup>c</sup> $\pm$ 63.4	154 <sup>b</sup> $\pm$ 38.0	194 <sup>b</sup> $\pm$ 11.2	171 <sup>b</sup> $\pm$ 42.7	329 <sup>a</sup> $\pm$ 45.3

<sup>a,b,c</sup>Different superscripts for the same parameter and day indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>A</sup> Pasteurised: high-pasteurised milk (90 °C for 15 s).



**Fig. 1.** Capillary electropherogram of the pH 4.6-insoluble fraction from an ultra-high pressure homogenised treated sample (200 MPa, 30 °C), after 1 day of storage ( $\beta$ -Lg =  $\beta$ -lactoglobulin, CN = casein) at 4 °C.

et al. (1999) working with a protease of *Pseudomonas fluorescens* in casein solutions observed that *para*- $\kappa$ -casein forms migrate in the region of  $\beta$ -Lg.

Residual casein data presented in Table 2 revealed that proteolysis immediately after treatment occurred in all treated samples, compared to raw milk. Significant differences between samples were detected only during storage at 4 °C. Levels of the residual  $\alpha_{s2}$ - and  $\beta$ -caseins, which are preferential substrates for PL, declined considerably during milk storage in all UHPH-treated samples, whereas  $\alpha_{s1}$ - and  $\kappa$ -caseins were hydrolysed to a lesser extent.

Milk treated at 300 MPa and 40 °C possessed a similar PL content to milk treated at the same pressure, but with an inlet temperature of 30 °C; nevertheless, lower hydrolysis of  $\alpha_{s2}$ -casein was produced compared to the other UHPH-treated milk samples. This difference could be related to the formation of fat aggregates, which were observed by Pereda et al. (2007) in samples treated at 300 MPa, being more pronounced at  $T_i = 40$  °C than at 30 °C. When clusters are formed through shared protein adsorbed onto the fat surface they could, in some way, protect casein fractions. The protein could be entrapped between a group of fat globules instead of being positioned on the surface of the fat globule and therefore, the accessibility of the enzyme to caseins could be partially restricted.

The  $\alpha_{s1}$ - and  $\kappa$ -caseins are more resistant to proteolysis by PL, but they are susceptible to attack by cathepsin D and microorganism proteases. Larsen et al. (2000) have demonstrated that cathepsin D has low heat stability. Approximately half of the procathepsin D-derived activity detected in milk serum remained after heat

treatment at 72 °C for 15 or 60 s; however, heat treatment at higher temperatures further reduced the enzyme activity. Therefore, cathepsin D is not considered as an important enzyme in high-pasteurised milk or UHPH-treated milk samples, where temperatures achieved during treatments are higher than 72 °C.

A slight decrease in the residual level of  $\alpha_{s1}$ -casein was observed for all samples during storage; however, this decrease was only significant for samples treated at 300 MPa at both inlet temperatures.

In general, the  $\kappa$ -casein did not undergo hydrolysis during storage, except in milk treated at 200 MPa and 40 °C, in which a significant difference was observed between days. Proteases from different species and strains of *Pseudomonas* spp. differ in their substrate specificities toward milk proteins, most proteinases being from psychrotrophs able to degrade  $\kappa$ -casein (Sorhaug & Stepianiak, 1997). Pereda et al. (2007) observed bacterial growth, using *Pseudomonas* agar base medium, in samples treated at 200 and 300 MPa with  $T_i = 40$  °C during the last days of storage. However, hydrolysis of  $\kappa$ -casein was detected in samples treated at 200 MPa, but not in milk treated at 300 MPa, probably due to the clusters previously mentioned.

According to De Noni et al. (2007) and Enright, Bland, Needs, and Kelly (1999), hydrolysis of  $\beta$ -casein, which can be produced by PL or microorganism proteases, is one of the main phenomena observed in milk samples. All UHPH-treated samples exhibited a significant decrease in  $\beta$ -casein residual level during storage, which was more pronounced in samples treated at 200 MPa 40 °C. Both the higher PL content, compared to milk samples treated at 300 MPa, and the presence of *Pseudomonas* spp. that can

secretate proteases, could explain the higher  $\beta$ -casein hydrolysis in 200 MPa, 40 °C milk sample.

Although PA milk had the same PL content as UHPH-treated samples at 300 MPa, during storage PA milk did not suffer additional proteolysis to that experienced after treatment. Differences in proteolysis between UHPH and PA samples are difficult to explain because high-pressure homogenisation could have exerted various effects. By using UHPH a decreased average micelle size by increasing pressure is produced (Hayes et al., 2003b; Sandra & Dalgleish, 2005), which can lead to a higher available protein surface area on which the enzyme can act, thus generating more proteolysis. It has been established that when heated, denatured  $\beta$ -Lg and casein form a complex by sulphhydryl–disulphide interchange which could impede or delay the accessibility of proteases to caseins *via* repulsion or steric hindrance. Also, homogenisation pressure could modify protein susceptibility to proteolytic action, i.e., changing protein conformation, which could expose new substrate sites. On the other hand, the PL system is quite complicated and, besides the effects of homogenisation pressure on PL and plasminogen themselves, it could have also affected the inhibitors of PL and PG activators.

### 3.3. pH 4.6-Soluble fraction

#### 3.3.1. Peptide profile

Peptide profiles of the pH 4.6-soluble fraction from raw and treated milk samples were almost similar in relation to qualitative aspects. In general, pasteurisation and pressure homogenisation

treatments of milk had no significant effects (immediately after treatment and during storage) on the levels of hydrophilic peptides, which are those produced by bacterial proteinases that elute early in the RP-HPLC profile (Datta & Deeth, 2003). In contrast, hydrophobic peptides were highly affected by the treatments applied (Fig. 2). The level of hydrophobic peptides increased during storage in all samples; however, this increase was significant ( $p < 0.05$ ) only in samples treated at 200 MPa. The hydrophobic peptide content, which is associated with bitter flavour, is highly related to the hydrolysis of  $\beta$ - and  $\alpha_{s1}$ -casein (Lemieux & Simard, 1991). This is in accordance with the results obtained in the present study, where the degree of  $\beta$ - and  $\alpha_{s1}$ -casein hydrolysis was negatively correlated with the hydrophobic peptide level; the milk that showed the highest  $\beta$ -casein hydrolysis and the highest hydrophobic peptide level was from the sample treated at 200 MPa and 40 °C, while PA and 300 MPa milk samples were the ones with a lower hydrophobic to hydrophilic peptide ratio, which suggests that these samples could have better flavour characteristics.

Peptide profile at day 21 of storage of 200 and 300 MPa treated samples with  $T_i = 40$  °C were characterised by a marked increase of two hydrophobic peaks at retention times of 21.5 and 30.5 min, which could be associated to the presence of *Pseudomonas* spp. in these samples, given that these peaks were not present in the others milk samples or in the milk samples with added  $\text{NaN}_3$ .

In order to evaluate proteolysis by means of an accelerated test, a microbial preservative ( $\text{NaN}_3$ ) was added to a fraction of treated milk samples (control samples) and they were incubated for 48 h

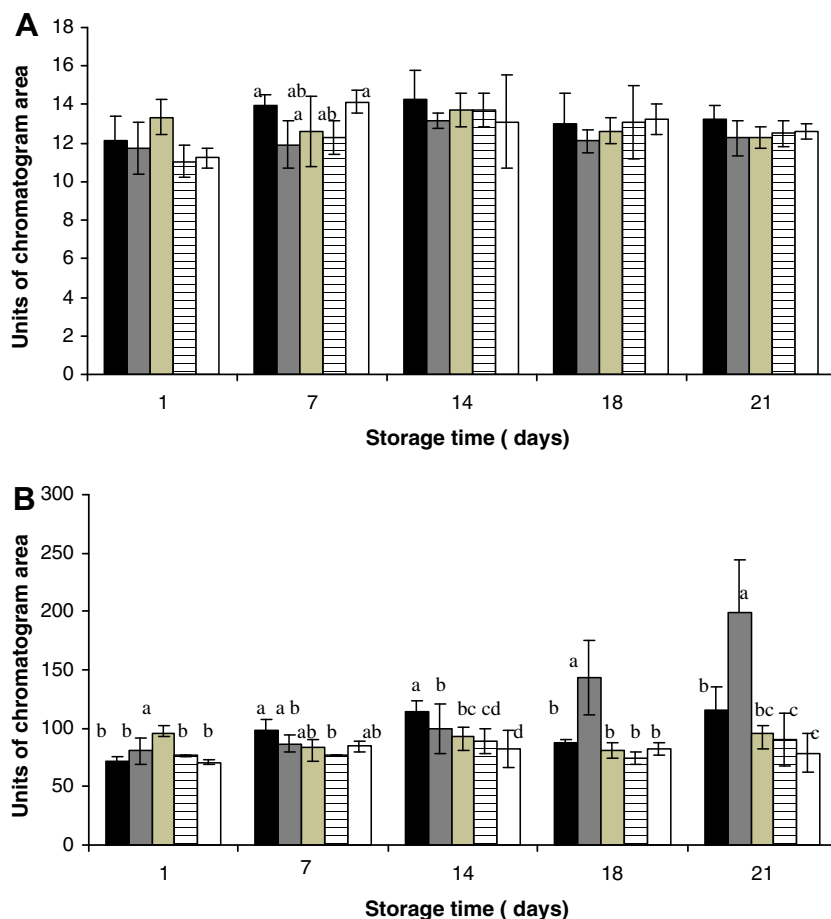


Fig. 2. Area count of hydrophilic (A) and hydrophobic (B) peptides present in the pH 4.6-soluble fraction of UHPH (200 MPa 30 °C (■), 200 MPa 40 °C (◼), 300 MPa 30 °C (▨), 300 MPa 40 °C (▩) and high-pasteurised milk (□) during storage at 4 °C. <sup>a,b,c,d</sup>Different superscripts for the same day indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



at 37 °C (incubated samples) and then peptides were studied (Table 3). Although no significant differences were detected in hydrophilic peptide level for each milk sample before and after incubation, there seems to be a slight increase, which was more noticeable in samples treated at 200 MPa. As was mentioned before, hydrophilic peptides are mostly produced by bacterial proteases. Since by adding NaN<sub>3</sub> no additional microbial proteases can be produced during storage, only proteases that could survive treatments can act on caseins to produce these peptides. The lower pressure (200 MPa) probably produced less microbial protease inactivation, which could explain the higher increase in hydrophilic peptides, compared to milk samples treated at 300 MPa. In relation to hydrophobic peptides, incubation at 37 °C favours PL activity. All milk samples exhibited a significant difference between the control and incubated sample. The higher the PL content was, the higher the hydrophobic peptide level after incubation.

### 3.3.2. pH 4.6-Soluble nitrogen and total free amino acids

Data obtained for FAA by the cadmium–ninhydrin method were inconsistent, without a clear trend during milk storage (data not shown; values of FAA were around 0.08–0.11 mg leucine/ml milk). The same oscillatory tendency was reported by Cladman, Scheffer, Goodrich, and Griffiths (1998) in whole and 2% fat pasteurised milk during storage at 4 °C, while Papachristou et al. (2006) observed a constant degree of proteolysis during storage of whole milk. In general, no significant differences were detected between samples at each sampling day and during refrigerated storage. By comparing day 1 with day 21 a slight, although not significant, increase in FAA content was observed for UHPH-treated samples with an inlet temperature of 40 °C. The production of FAA is related with the presence of microbial proteases, which can degrade large-medium casein peptides to low molecular weight peptides and FAA, the presence of *Pseudomonas* spp. in these samples could probably be related to the increase in FAA observed.

The level of pH 4.6-SN in raw milk (~0.2% of total N) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in UHPH and high-pasteurised samples (~0.15–0.17% of total N), due to the presence of native whey proteins, which in treated samples are partially denatured particularly in PA milk. During storage a slight increase of pH 4.6-SN was observed in all samples, and milk treated at 200 MPa and 40 °C was the one that exhibited the highest increase ( $p < 0.05$ ). The content of pH 4.6-SN will be partially determined by the level of hydrophilic and hydrophobic peptides presents in the pH 4.6-soluble fraction. Hydrophobic peptides were present at a higher percentage than the hydrophilic peptides; therefore, the amount of hydrophobic peptides could have an influence on the pH 4.6-SN. The same relationship of hydrophobic peptides with pH 4.6-SN was

observed for samples with added NaN<sub>3</sub>, used in the test of accelerated proteolysis.

## 4. Conclusions

Proteolysis of milk during storage is a major deteriorative reaction (together with lipolysis and oxidation) limiting its shelf-life; therefore the knowledge of the cause that produces this biochemical change is important, in order to help manufacturers find appropriate conditions of treatment and storage. The present study of proteolysis in milk during storage at 4 °C indicated the greater importance of PL compared to microbial proteases in this biochemical phenomenon. The indigenous milk proteolytic enzyme, PL, is as susceptible to inactivation in milk treated at 300 MPa as in PA milk. The results obtained showed that PA milk was the sample that had the lowest casein hydrolysis during storage, while UHPH-treated sample at 200 MPa and 40 °C was the one that showed the most important casein breakdown ( $p < 0.05$ ).

In general, no great differences were observed between samples in the levels of hydrophilic peptides; however, the proportion of hydrophobic peptides was correlated to casein hydrolysis, mainly  $\beta$ - and  $\alpha_{s1}$ -casein. As the pH 4.6-SN is affected by the peptides present, and since hydrophilic peptide level did not show differences between samples, pH 4.6-SN content also had a relation with hydrophobic peptide amount and therefore with casein hydrolysis. Evolution of FAA for all treated samples during storage did not exhibit a clear behaviour.

Although, UHPH-treated samples exhibited higher casein hydrolysis compared to PA milk, there were no significant differences in peptide and pH 4.6-SN content between UHPH-treated samples at 300 MPa and PA milk. These results suggest that these samples could probably have similar flavour characteristics, while samples treated at 200 MPa and 40 °C would not be used as an alternative to thermal treatment, since the high content of hydrophobic peptides could be related to bitterness, gelation and sedimentation, and therefore to a reduced shelf-life. To determine if these chemical differences between samples are appreciated by consumers or not, sensory analyses of milk are in progress in our laboratories.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the European Union for the financial support given to this investigation (CRAFT Project No. 512626), and Julieta Pereda acknowledges a predoctoral fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR).

## References

- Baldi, A., Savoini, G. C. F., Fantuz, F., Senatore, E., Bertocchi, L., & Politis, I. (1996). Changes in plasmin–plasminogen–plasminogen activator system in milk from Italian herds. *International Dairy Journal*, 6, 1045–1053.
- Bastian, E. D., & Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: An update. *International Dairy Journal*, 6, 435–457.
- Cladman, W., Scheffer, S., Goodrich, N., & Griffiths, M. W. (1998). Shelf life of milk packaged in plastic containers with and without treatment to reduce light transmission. *International Dairy Journal*, 8, 629–636.
- Datta, N., & Deeth, H. C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 173–182.
- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., & Kelly, A. L. (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 1–7.
- De Noni, I., Pellegrino, L., Cattaneo, S., & Resmini, P. (2007). HPLC of proteose peptones for evaluating ageing of packaged pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 17, 12–19.
- Enright, E., Bland, A. P., Needs, E. C., & Kelly, A. L. (1999). Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO<sub>3</sub> addition. *International Dairy Journal*, 9, 581–591.
- Farkye, N. Y., & Fox, P. F. (1992). Contribution of plasmin to cheddar cheese ripening: Effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59, 209–216.

**Table 3**

Mean values  $\pm$  standard deviation of hydrophobic and hydrophilic peptides (chromatographic area units) of raw and treated milk samples with added NaN<sub>3</sub> before and after incubation at 37 °C

	Hydrophilic peptides		Hydrophobic peptides	
	Control <sup>A</sup>	Incubated <sup>B</sup>	Control	Incubated
Raw	14.1 $\pm$ 0.71	14.6 $\pm$ 1.3	98.4 <sup>b</sup> $\pm$ 6.65	161.2 <sup>a</sup> $\pm$ 22.9
200 MPa, 30 °C	12.7 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 0.38	83.1 <sup>b</sup> $\pm$ 9.29	144 <sup>a</sup> $\pm$ 35.5
300 MPa, 30 °C	13.6 $\pm$ 0.33	13.7 $\pm$ 0.8	80.2 <sup>b</sup> $\pm$ 8.82	108 <sup>a</sup> $\pm$ 29.0
200 MPa, 40 °C	12.8 $\pm$ 0.36	13.0 $\pm$ 0.46	67.4 <sup>b</sup> $\pm$ 7.48	132 <sup>a</sup> $\pm$ 21.5
300 MPa, 40 °C	12.9 $\pm$ 0.74	13.4 $\pm$ 0.99	70.2 <sup>b</sup> $\pm$ 6.21	116 <sup>a</sup> $\pm$ 14.8
Pasteurized <sup>C</sup>	13.0 $\pm$ 1.17	13.6 $\pm$ 1.12	67.2 <sup>b</sup> $\pm$ 5.88	94.5 <sup>a</sup> $\pm$ 15.0

<sup>a,b</sup>Different superscripts for the same parameter and sample indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>A</sup> Control: milk sample with 0.07% of NaN<sub>3</sub>.

<sup>B</sup> Incubated: milk sample with 0.07% of NaN<sub>3</sub> that is incubated at 37 °C for 48 h.

<sup>C</sup> Pasteurized: high-pasteurised milk (90 °C for 15 s).

- Folkertsma, B., & Fox, P. F. (1992). Use of the Cd–ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 217–224.
- García-Risco, M. R., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (1999). Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1171–1178.
- Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 25–33.
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003b). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297–305.
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003a). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70, 307–313.
- IDF (2002). Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. IDF Standard, 185.
- Kennedy, A., & Kelly, A. L. (1997). The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. *International Dairy Journal*, 7, 717–721.
- Kohlmann, K. L., Nielsen, S. S., & Ladisch, M. R. (1991). Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *Journal of Dairy Science*, 74, 4125–4136.
- Larsen, L. B., Wium, H., Benfeldt, C., Heegaard, C. W., Ardö, Y., Qvist, K. B., et al. (2000). Bovine milk procathepsin D: Presence and activity in heated milk and in extracts of rennet-free UF-Feta cheese. *International Dairy Journal*, 10, 67–73.
- Lemieux, L., & Simard, R. E. (1991). Bitter flavour in dairy products I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait*, 71, 599–636.
- Metwalli, A. A. M., de Jongh, H. H. J., & van Boekel, M. A. J. S. (1998). Heat inactivation of bovine plasmin. *International Dairy Journal*, 8, 47–56.
- Papachristou, C., Badeka, A., Chouliara, E., Kondyli, E., Athanasoulas, A., & Kontominas, M. G. (2006). Evaluation of polyethylene terephthalate as a packaging material for premium quality whole pasteurised milk in Greece. *European Food Research and Technology*, 223, 711–718.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenisation on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1081–1093.
- Prado, B. M., Sombers, S. E., Ismail, B., & Hayes, K. D. (2006). Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk. *International Dairy Journal*, 16, 593–599.
- Recio, I., & Olieman, C. (1996). Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 17, 1228–1233.
- Recio, I., Pérez-Rodríguez, M. L., Ramos, M., & Amigo, L. (1997). Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *Journal of Chromatography A*, 768, 47–56.
- Richardson, B. C. (1983). The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurisation on their activity. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 233–252.
- Richardson, B. C., & Pearce, K. N. (1981). The determination of plasmin in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16, 209–220.
- Saint Denis, T., Humbert, G., & Gaillard, J.-L. (2001). Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: A revisited study. *Lait*, 81, 715–729.
- Sandra, S., & Dalgleish, D. G. (2005). Effects of ultra-high pressure homogenisation and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*, 1–10.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*, 17, 782–790.
- Sorhaug, T., & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 35–41.
- Srinivasan, M., & Lucey, J. A. (2002). Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, 85, 1070–1078.
- Statistical Analysis Systems Institute (2004). *Users guide*. Cary, NC: SAS Institute Inc. (Version 9.1.3).
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13, 427–439.
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Trujillo, A. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenisation on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 13–23.



## *Artículo 5*

### **3.5 EFFECTS OF ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION TREATMENT ON THE LIPOLYSIS AND LIPID OXIDATION OF MILK DURING REFRIGERATED STORAGE.**

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 7125-7130, (2008).





## Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization Treatment on the Lipolysis and Lipid Oxidation of Milk during Refrigerated Storage

JULIETA PEREDA, VICTORIA FERRAGUT, JOAN MIQUEL QUEVEDO,  
 BUENAVENTURA GUAMIS, AND ANTONIO J. TRUJILLO\*

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XaRTA, XiT,  
 Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de  
 Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Free fatty acid (FFA) release and quantification and lipid oxidation extent of ultra-high-pressure homogenized (UHPH) milk samples were evaluated to assess the effect of UHPH on the susceptibility of milk lipids to lipolysis and oxidation. Milk was UHPH-treated at 200 and 300 MPa with inlet temperatures of 30 and 40 °C. UHPH-treated samples were compared to high-pasteurized milk (PA; 90 °C, 15 s). Results showed that all FFA increased significantly during storage only in 200 MPa samples. Lipid oxidation was measured as an accumulation of lipid hydroperoxides as the primary oxidation product and malondialdehyde and hexanal as the secondary oxidation products. Samples treated at 300 MPa presented higher malondialdehyde and hexanal content compared to 200 MPa treated-samples and to PA milk.

**KEYWORDS:** Milk; lipolysis; lipid oxidation; ultra-high-pressure homogenization

### INTRODUCTION

The development of off-flavors in milk can reduce the shelf life and quality of pasteurized fluid milk (1), with lipolysis, lipid oxidation, and the growth of bacteria being the main phenomena that participate in the modification of the overall flavor. The hydrolysis of triglycerides into free fatty acids (FFA) and partial glycerides is called lipolysis in milk. This reaction can be either spontaneous or induced. The former one occurs when milk is cooled to <10 °C just after milking, while induced lipolysis is related to physical changes in the original fat globule membrane (MFGM) occurring during agitation, foaming, homogenization, and freezing (2).

Lipolysis in milk can be catalyzed by two enzymatic processes, one of them caused by the native milk lipoprotein lipase (LPL; EC 3.1.1.34) and the other by microbial lipases produced by psychrotrophic microorganisms. Since LPL is relatively unstable to heat, pasteurization inactivates most of the enzyme, and therefore, lipolysis does not occur in pasteurized homogenized milk (2). When lipolysis occurs in milk, it produces detrimental aspects such as flavor and functionality defects, and the short- and medium-chain FFA (C<sub>4:0</sub>-C<sub>12:0</sub>) released are those that cause the appearance of rancid flavors (3). Although flavor defects are the most likely result of lipolysis in milk, other consequences may arise from an elevated level of FFA such as a decrease in milk foaming ability due to partial glycerides, which are surface active and displace the foam-

stabilizing proteins at the air–water interface of the foam bubbles (4). However, FFA also plays an important role in providing the desirable flavor of milk products, such as cheese.

Lipid oxidation is a chemical reaction that has received much attention because of its contribution to a decrease in sensory and nutritional qualities of foods. Cholesterol, fatty acids of triacylglycerols, partial glycerides, and free fatty acids, particularly unsaturated fatty acids, are vulnerable to oxidation and give rise to unstable hydroperoxides, which decompose into a wide range of carbonyl compounds, such as saturated and unsaturated aldehydes followed by lesser amounts of unsaturated ketones, saturated and unsaturated hydrocarbons, semialdehydes, and saturated and unsaturated alcohols (5). The oxidative stability of milk is also affected by diverse pro-oxidative factors (such as the presence of oxygen, light, endogenous and exogenous metals, and enzymes such as xanthine oxidase and lactoperoxidase), antioxidative factors (i.e. ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, thiols, and enzymes such as superoxide dismutase) and the balance between pro- and antioxidative factors (5, 6).

In general, thermal treatment improves the safety and shelf life of milk; however, the flavor and nutritional value can be negatively affected (7). Consumer acceptance of fluid milk is determined mainly by its sensory characteristics and by its nutritional value; therefore, alternative nonthermal technologies are being studied. One of these alternative technologies is ultra-high-pressure homogenization (UHPH), which is based on the same principle as conventional homogenization but works at higher pressures, up to 400 MPa compared to 20–50 MPa

\* Corresponding author. Tel: +34. 935813292. Fax: +34 0.935812006.  
 E-mail: Toni.Trujillo@uab.es.

for conventional homogenization. Cavitation, friction, turbulence, and shear stress are the forces encountered during UHPH (8). In recent years, applications of UHPH have been described in milk (9), cheese (10), and yogurt (11) production. Reports on the effect of UHPH on milk have demonstrated its ability to reduce microbial counts (9, 12), denature whey proteins (10, 13), inactivate indigenous milk enzymes such as plasmin and alkaline phosphatase (13, 14), and drastically reduce fat globule size (9, 15, 16). The initial step in lipid oxidation in emulsions takes place at the interface between the oil and water phases (17). It is important to note that high-pressure homogenization reduces the droplet size and consequently increases the total interfacial area of the emulsion. One would therefore expect the rate of lipid oxidation to increase as the droplet size of emulsion decreases because a greater amount of lipid would be exposed to the aqueous phase. However, some studies in emulsions support this hypothesis, while other studies have found no dependence of the lipid oxidation rate on droplet size (18).

Until now, it is known that UHPH reduces fat globule size and also that UHPH appears to enhance the activity of LPL compared to a thermal treatment (19); however, it is not known whether this reduction of fat globule size and residual LPL activity is detrimental for lipid oxidation and lipolysis of milk. Therefore, the aim of the present work has been to study the FFA profile and lipid oxidative changes during storage at 4 °C in milk submitted to UHPH treatments and in thermally processed milk.

## MATERIALS AND METHODS

**Milk Supply.** Fresh raw whole milk ( $11.6 \pm 1.0\%$  total solids and  $3.29 \pm 0.03\%$  protein) was obtained from a local dairy farm (Can Badó, Barcelona, Spain). Milk was standardized at  $3.5 \pm 0.2\%$  fat, and then it was kept overnight at 4 °C.

**Ultra-High-Pressure Homogenization and Heat-Pasteurization of Milk.** UHPH treatments were applied to the milk samples using a Stansted high-pressure homogenizer (model FPG11300, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). This high-pressure machine comprises two intensifiers, driven by a hydraulic pump and a high-pressure valve made of resistant ceramics capable of supporting 350 MPa. It also comprises a second pneumatic valve capable of supporting 50 MPa located behind the first one. The flow rate in the machine during the process was 120 L/h. Milk was treated at 200 and 300 MPa with inlet temperatures (Ti) of 30 and 40 °C. The inlet temperatures of milk were reached by passing milk through a heat exchanger located behind the feeding tank. During UHPH treatments an increase in milk temperature ( $\sim 19$  °C per 100 MPa) is produced as a consequence of the adiabatic heating generated in the machine in addition to the high turbulence and shear and cavitation forces that the fluid suffers in the homogenization valve. Throughout the experiment, the range of milk temperature was 34 to 44 °C before the first valve and 74 to 101 °C before the second valve. In order to minimize temperature retention after treatment, two spiral type heat-exchangers (Garvía, Barcelona, Spain) located behind the second valve were used; therefore, the holding time at the highest temperature was very short, around half-second.

Ultra-high-pressure-treated samples were compared with a high-pasteurized milk (PA). Two-stage homogenization (18 MPa plus 2 MPa) and pasteurization (90 °C for 15 s) of raw milk were carried out with a Niro Soavi homogenizer (model X68P, Parma, Italy) and a Finamat heat exchanger (model 6500/010, Gea Finnah GmbH, Ahaus, Germany), respectively.

Milk samples were collected and stored at 4 °C in the dark. Immediately after treatment and at each day of sampling (7, 14, and 18 days), milk samples were frozen at  $-80$  °C until lipolysis and oxidation analyses were performed. Three replications were performed.

**Lipolysis. Free Fatty Acids Analysis.** Free fatty acids were extracted according to the method described by de Jong and Badings (20). Ten

milliliters of milk was mixed in a screw-capped tube with 1 g of anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mL of ethanol, 1 mL of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2.5 M), and 30  $\mu\text{L}$  of internal standard solution (heptanoic acid 36.8 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Dry diethyl ether/heptane (10 mL 1:1 v/v) was added, and the mixture was shaken for 3 min using a vortex mixer. After centrifugation at 2500 rpm for 2 min, the supernatant was transferred to a screw-capped tube containing 1 g of anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Extraction was repeated twice but with 4 mL of dry diethyl ether/heptane.

Isolation of FFA from the ether/heptane extract was done using a solid phase extraction technique with aminopropyl column Spe-ed  $\text{NH}_2$  500  $\text{mg} \cdot 3 \text{ mL}^{-1}$  (Applied Separations, Allentown, PA, USA). The aminopropyl column was conditioned with 10 mL of heptane before the lipid extract was applied to the column. Then hexane/2-propanol (20 mL; 3:2 v/v) was used to eliminate glycerides, and finally, the FFA were eluted with 5 mL of dry diethyl ether containing 2% formic acid. All organic solvents were purchased from Panreac (Barcelona, Spain), while formic acid and sulfuric acid were acquired from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). All chemical used were of analytical grade.

Analysis of FFA was carried out with an HP 6890 Series II gas chromatograph (Hewlett-Packard Inc., Wilmington, DL, USA) using a fused silica capillary column, (30 m  $\times$  0.32 mm i.d.), coated with DB-FFAP with a film thickness 0.25  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific, Folsom, California, USA) and a flame-ionization detector. Helium was the carrier gas with a constant flow of 2  $\text{mL min}^{-1}$ . The initial column temperature of 75 °C was maintained for 1 min, then raised to 240 °C at a rate of 5 °C  $\text{min}^{-1}$ , and then held at 240 °C for 21 min. Injection was done in split mode with a 7:1 split ratio and an injector temperature of 250 °C. The detector temperature was 300 °C. Each fatty acid was identified with reference to the retention time of the analytical grade standards supplied by Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), and quantified with respect to the internal standard ( $\text{C}_{7:0}$ ).

**Indicators of Lipid Oxidation. Hydroperoxide Value Determination.** Lipid hydroperoxides in milk were determined by using the method described by Ostdal et al. (21). Milk (2 mL) was mixed with 2 mL of methanol. Then, 4 mL of chloroform was added and vortexed for 30 s. After centrifugation for 10 min at 12000g, 1 mL of the chloroform phase was transferred to a test tube, was mixed with 1 mL of Fe (II)/thiocyanate in methanol/chloroform, and was kept at room temperature for 5 min to allow the reaction. This reaction consists of the oxidation of ferrous to ferric ion by hydroperoxides in the presence of ammonium thiocyanate to produce ferric thiocyanate whose absorbance can be measured at 500 nm. Milk samples were analyzed in quadruplicate, and data were expressed as units of absorbance.

**Malondialdehyde–Thiobarbituric Acid (MDA–TBA) Determination.** Secondary oxidation products such as MDA were determined with the spectrophotometric method described by Fenaille et al. (22). Milk (3 mL) was mixed with 2.4 mL of 5% trichloroacetic acid (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and 2.4 mL of 0.8% butylated hydroxytoluene (Sigma Aldrich, St Louis, USA) in ethanol. The mixture was centrifuged at 2700g for 5 min, and then the upper phase was filtered through Whatman paper No. 1 and heated at 70 °C for 1 h. After cooling, the third derivative spectrum of MDA–TBA solutions was recorded from 400 to 650 nm at a scanning speed of 800 nm/min against the blank reaction mixture. Peak height measurements were performed at 521.5 nm. During this TBA analysis, besides MDA other substances such as ketones, ketosteroids, acids, esters, sugars, imides and amides, amino acids, oxidized proteins, and pyridines and pyrimidines can react with the TBA, and are called TBARS (substances that react with TBA) (22). The concentration of these TBARS in samples was determined using an external calibration curve of malondialdehyde and was expressed as  $\mu\text{g MDA/mL}$  milk. Three replicates of each sample were analyzed.

**Hexanal Content.** Hexanal was analyzed using a solid phase microextraction technique with a 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/Carboxen/PDMS fiber (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) in combination with gas chromatography–mass spectrometry according to the method described by Pereda et al. (23). In order to quantify hexanal content, a standard addition of 0 to 15 ppb of hexanal (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was made in a milk sample with a low level of this compound.

**Statistical Analysis.** Results were analyzed by an analysis of variance ANOVA using the general linear models procedure of Statistical Analysis System (SAS, 2004). Data are presented as least-

**Table 1.** Means  $\pm$  Standard Deviation of Free Fatty Acids (mg FFA/L milk) Found in Raw, Ultra-High-Pressure Homogenized (200 MPa 30 °C, 200 MPa 40 °C, 300 MPa 30 °C, and 300 MPa 40 °C), and High-Pasteurized Milk Samples during Refrigerated Storage at 4 °C<sup>a</sup>

	day	treatment					PA <sup>b</sup>
		raw	200 MPa 30 °C	300 MPa 30 °C	200 MPa 40 °C	300 MPa 40 °C	
C4:0	1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1
	7		1.7 a $\pm$ 0.7	0.2 b $\pm$ 0.0	0.3 b $\pm$ 0.1	0.2 b $\pm$ 0.0	0.3 b $\pm$ 0.1
	18		4.3 a $\pm$ 3.5	0.3 b $\pm$ 0.1	0.6 b $\pm$ 0.2	0.3 b $\pm$ 0.1	0.4 b $\pm$ 0.3
C6:0	1	0.8 a $\pm$ 0.2	0.7 a,b $\pm$ 0.4	0.6 a,b $\pm$ 0.2	0.5 b $\pm$ 0.1	0.5 a,b $\pm$ 0.1	0.5 a,b $\pm$ 0.2
	7		2.6 a $\pm$ 0.7	0.5 b $\pm$ 0.1	0.6 b $\pm$ 0.3	0.4 b $\pm$ 0.0	0.5 b $\pm$ 0.1
	18		6.0 a $\pm$ 5.2	0.5 b $\pm$ 0.1	1.3 b $\pm$ 0.2	0.5 b $\pm$ 0.1	0.6 b $\pm$ 0.3
C8:0	1	0.8 b $\pm$ 0.1	1.0 a $\pm$ 0.3	0.7 b,c $\pm$ 0.2	0.5 c,d $\pm$ 0.0	0.5 d $\pm$ 0.0	0.6 c,d $\pm$ 0.1
	7		3.5 a $\pm$ 1.4	0.6 b $\pm$ 0.1	0.7 b $\pm$ 0.3	0.5 b $\pm$ 0.0	0.5 b $\pm$ 0.2
	18		7.5 a $\pm$ 6.3	0.6 b $\pm$ 0.2	1.6 b $\pm$ 0.4	0.6 b $\pm$ 0.1	0.6 b $\pm$ 0.3
C10:0	1	1.9 b $\pm$ 0.1	2.6 a $\pm$ 0.8	1.8 b $\pm$ 0.4	1.3 b $\pm$ 0.2	1.4 b $\pm$ 0.1	1.6 b $\pm$ 0.3
	7		9.0 a $\pm$ 4.4	1.5 b $\pm$ 0.1	1.8 b $\pm$ 0.8	1.3 b $\pm$ 0.1	1.5 b $\pm$ 0.3
	18		19.3 a $\pm$ 14.3	1.5 b $\pm$ 0.5	4.4 b $\pm$ 1.1	1.5 b $\pm$ 0.2	2.0 b $\pm$ 1.0
C12:0	1	3.1 b $\pm$ 0.3	4.8 a $\pm$ 1.7	3.1 b $\pm$ 0.6	2.6 b $\pm$ 0.2	2.5 b $\pm$ 0.2	3.4 b $\pm$ 1.1
	7		13.4 a $\pm$ 5.8	2.6 b $\pm$ 0.3	3.4 b $\pm$ 1.7	2.2 b $\pm$ 0.3	3.3 b $\pm$ 1.2
	18		27.5 a $\pm$ 20.0	2.9 b $\pm$ 0.7	6.5 b $\pm$ 2.1	2.8 b $\pm$ 0.4	3.6 b $\pm$ 1.7
C14:0	1	6.6 b,c $\pm$ 0.6	11.9 a $\pm$ 2.5	6.9 b,c $\pm$ 1.7	5.8 c $\pm$ 0.8	5.6 c $\pm$ 0.4	8.5 b $\pm$ 2.0
	7		35.9 a $\pm$ 19.0	6.0 b $\pm$ 0.2	7.8 b $\pm$ 2.7	5.1 b $\pm$ 0.3	8.1 b $\pm$ 2.2
	18		62.6 a $\pm$ 32.5	6.5 b $\pm$ 1.0	14.7 b $\pm$ 3.2	6.4 b $\pm$ 1.7	8.7 b $\pm$ 2.8
C16:0	1	20.8 c $\pm$ 3.0	45.9 a $\pm$ 5.1	23.3 c $\pm$ 6.6	20.5 c $\pm$ 4.6	19.6 c $\pm$ 2.8	31.5 b $\pm$ 6.0
	7		138.1 a $\pm$ 80.9	20.2 b $\pm$ 2.3	26.2 b $\pm$ 7.3	17.2 b $\pm$ 1.8	29.8 b $\pm$ 6.7
	18		215.8 a $\pm$ 84.0	22.6 b $\pm$ 2.0	51.2 b $\pm$ 9.9	22.4 b $\pm$ 8.9	32.1 b $\pm$ 7.7
C18:0	1	4.6 b $\pm$ 0.8	9.2 a $\pm$ 1.3	5.8 b $\pm$ 2.8	4.1 b $\pm$ 1.3	4.0 b $\pm$ 0.5	6.1 b $\pm$ 1.8
	7		25.4 a $\pm$ 10.5	4.1 b $\pm$ 0.5	4.8 b $\pm$ 1.2	3.6 b $\pm$ 0.5	5.3 b $\pm$ 1.2
	18		46.3 a $\pm$ 26.1	4.6 b $\pm$ 0.5	10.3 b $\pm$ 3.1	4.2 b $\pm$ 1.4	6.3 b $\pm$ 1.3
C18:1	1	13.1 b $\pm$ 2.8	24.4 a $\pm$ 2.0	15.2 b $\pm$ 6.4	12.0 b $\pm$ 4.9	11.3 b $\pm$ 3.4	15.7 b $\pm$ 1.3
	7		103.4 a $\pm$ 50.9	12.6 b $\pm$ 2.4	16.3 b $\pm$ 4.6	10.7 b $\pm$ 2.0	14.4 b $\pm$ 0.6
	18		193.5 a $\pm$ 101.3	14.3 b $\pm$ 3.0	27.0 b $\pm$ 13.0	13.2 b $\pm$ 5.8	18.4 b $\pm$ 4.8
C18:2	1	0.6 b $\pm$ 0.2	0.9 a $\pm$ 0.3	0.5 b $\pm$ 0.1	0.5 b $\pm$ 0.1	0.5 b $\pm$ 0.1	0.6 b $\pm$ 0.1
	7		5.3 a $\pm$ 2.4	0.5 b $\pm$ 0.0	0.7 b $\pm$ 0.3	0.6 b $\pm$ 0.3	0.6 b $\pm$ 0.1
	18		7.8 a $\pm$ 6.0	0.6 b $\pm$ 0.1	1.8 b $\pm$ 0.3	0.6 b $\pm$ 0.2	0.8 b $\pm$ 0.4
total ( $\Sigma$ C4–C18:2)	1	52.7 b,c $\pm$ 6.7	101.7 a $\pm$ 14.6	58.2 b,c $\pm$ 7.7	48.2 c $\pm$ 6.6	46.0 c $\pm$ 6.3	68.8 b $\pm$ 9.9
	7		338.4 a $\pm$ 47.8	48.9 b $\pm$ 6.6	62.6 b $\pm$ 8.5	41.9 b $\pm$ 5.6	64.3 b $\pm$ 9.4
	18		590.8 a $\pm$ 79.2	54.5 b $\pm$ 7.4	119.4 b $\pm$ 16.0	52.5 b $\pm$ 7.2	73.5 b $\pm$ 10.3

<sup>a</sup> Different letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). <sup>b</sup> PA = High-pasteurized milk (90 °C for 15 s).

square means. The Tukey test was used for the comparison of sample data. Evaluations were based on a significance level of  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

**Free Fatty Acids.** At the first day of storage, total FFA content was approximately double ( $P < 0.05$ ) in a UHPH-treated sample at 200 MPa 30 °C compared with the other UHPH samples and PA milk (Table 1), with C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, and C<sub>16:0</sub> being the major FFA detected in milk samples. Esterification of principal fatty acids in milk is not random: palmitic acid (C<sub>16:0</sub>) and stearic acid (C<sub>18:0</sub>) are esterified mainly at position sn-1 of triglycerides, while unsaturated fatty acids are esterified mainly at positions sn-1 and sn-3 of triglycerides. Lipolysis in milk can be produced by natural lipases, such as LPL, which is completely inactivated by an HTST heat treatment (72 °C  $\times$  15 s) or by microbial lipases from psychrotrophic bacteria, which are thermoresistant at the temperatures of pasteurization and even to UHT treatments (4). The LPL hydrolyses preferentially positions 1 and 3 of long-chain triglycerides (4), which is related to the higher level of C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, and C<sub>18:1</sub> FFA. In treatment at 200 MPa 30 °C, temperature achieved after the high-pressure valve

was around 75 °C, while higher temperatures (from 85 to 100 °C depending on the combination of pressure-temperature) were reached in the other UHPH treatments. Probably, 75 °C combined with the short time at which the fluid is maintained at this temperature was not high enough to inactivate milk LPL completely. As a consequence of the damage to the original MFGM and the reduction of fat globule size after homogenization treatments, this enzyme could easily gain access to the fat and could find greater interfacial fat surface area on which to act, generating lipolysis in the milk. Hayes and Kelly (15) working with UHPH at pressures from 50 to 200 MPa observed a decrease in pH after refrigeration at 4 °C for 24 h, and they suggested that LPL was probably not completely inactivated by the conditions of pressure-temperature used in the study. Several authors have studied the effect of UHPH on the inactivation of milk enzymes such as plasmin, lactoperoxidase, and alkaline phosphatase (9, 14, 19). However, the effect of UHPH on LPL is not well understood. Datta et al. (19) studied the inactivation of milk lipase by UHPH, and they observed that UHPH did not cause more inactivation of LPL than the corresponding thermal treatment; on the contrary,



pressure homogenization treatment seems to enhance the activity of the enzyme.

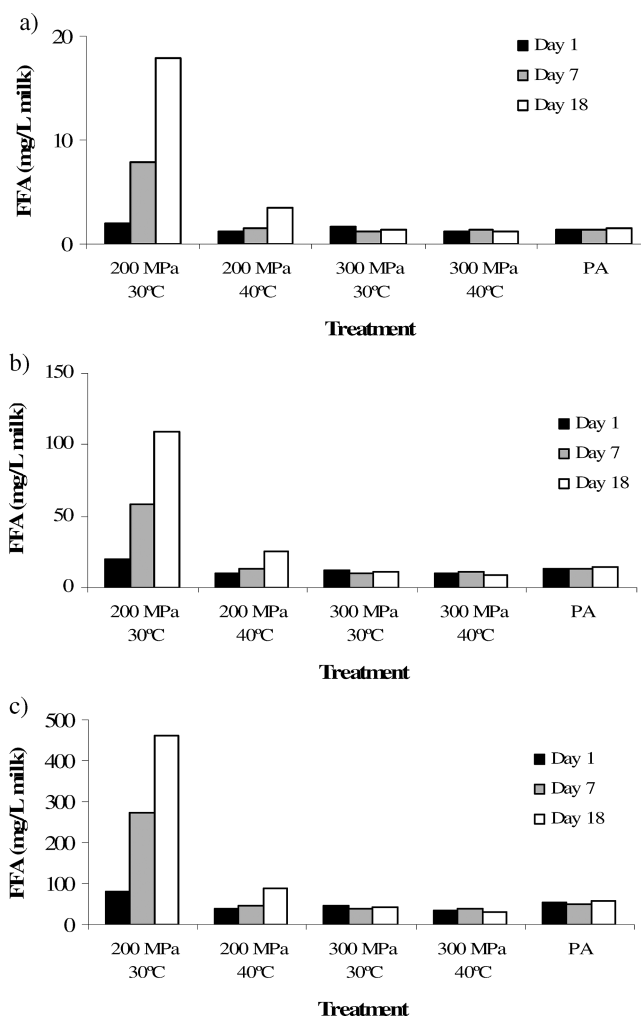
During refrigerated storage at 4 °C, total FFA content increased in all samples; however, this increase was statistically significant ( $P < 0.05$ ) between days only for samples treated at 200 MPa at both inlet temperatures. As was explained before, the signs of lipolysis in 200 MPa and 30 °C were observed from the first day of storage, total FFA concentration of this sample being approximately 100 mg FFA/L compared to 50 mg FFA/L in the other milk samples. In the case of 200 MPa and 40 °C, the increase in FFA started to be noticeable from the seventh day of storage.

In a previous study, Pereda et al. (9) reported the presence of *Pseudomonas* spp. at the end of storage (day 18) in milk treated at 200 and 300 MPa at  $T_i = 40$  °C, which could produce microbial lipases. The delay in the increase of FFA content toward the end of storage in the milk sample treated at 200 MPa 40 °C combined with temperature achieved in this treatment (85 °C), able to inactivate LPL, and the presence of *Pseudomonas* spp., suggests that lipolysis could be a consequence of the microbial lipases but not caused by LPL. However, although *Pseudomonas* spp. were present both in samples treated at 200 and 300 MPa at  $T_i = 40$  °C, 300 MPa at 40 °C-treated milk did not experience such an intense lipolysis at the end of storage as 200 MPa 40 °C milk did. This difference could be explained by the presence of clusters of fat globules that have been observed by different authors (9, 13, 16) in milk samples treated at 300 MPa, which could produce an increase in the fat droplet particle size and therefore less interfacial area on which the *Pseudomonas* spp. lipases can act.

**Figure 1** shows the evolution of short-chain FFA ( $C_{4:0}$ - $C_{8:0}$ ; SCFFA), medium-chain FFA ( $C_{10:0}$ - $C_{14:0}$ ; MCFFA), and long-chain FFA ( $C_{16:0}$ - $C_{18:2}$ ; LCFFA) at each sampling time for the different treated samples. The SCFFA represented approximately 2% of the total FFA content in all milk samples, while MCFFA and LCFFA represented 20 and 78%, respectively. As can be seen in **Table 1**, myristic acid ( $C_{14:0}$ ) was the predominant FFA in the MCFFA group, while palmitic ( $C_{16:0}$ ), stearic ( $C_{18:0}$ ), and oleic ( $C_{18:1}$ ) acids were the main FFA in the LCFFA group and also the major FFA in milk samples. This is in accordance with the FFA composition detected in pasteurized milk by de Jong and Badings (20); however, concentration of these FFA were lower in our study. These differences in concentration could be related to the experimental chromatographic conditions and especially to the mode of injection (split).

The relative increase in the concentration of SCFFA during storage was higher than that of MCFFA and LCFFA, and was more pronounced in samples treated at 200 MPa. This increase in SCFFA could be explained by the specificity of LPL to act on primary ester bonds with some preference for the *sn*-1 and the *sn*-3 positions of triglycerides (4). In general, position *sn*-3 is occupied by SCFFA. Free fatty acids, particularly SCFFA and MCFFA have strong flavors that in elevated concentrations are described as rancid, butyric, and astringent (3). LCFFA have little contribution to the development of off-flavors; however, unsaturated fatty acids such as oleic  $C_{18:1}$  and linoleic  $C_{18:2}$  are vulnerable to oxidation and to producing a metallic flavor.

**Lipid Oxidation.** Lipid oxidation is a free-radical chain reaction involving initiation, propagation, and termination stages. The initial step in the autoxidation of unsaturated fatty acids is the formation of free radicals, which then react with molecular oxygen to form a peroxide free radical. This free radical reacts with another unsaturated molecule to continue the reaction and generate a hydroperoxide. Hydroperoxides are the primary



**Figure 1.** Evolution of (a) short-chain FFA, (b) medium-chain FFA, and (c) long-chain FFA in ultra-high-pressure homogenized (200 MPa 30 °C, 200 MPa 40 °C, 300 MPa 30 °C, and 300 MPa 40 °C) and high-pasteurized (PA) samples during storage.

oxidation products generated during the lipid oxidation reaction, which decompose mainly into aldehydes and unsaturated ketones (secondary oxidation products) (5).

Analytical values obtained for the secondary oxidation products, TBARS and hexanal, and for the primary oxidation product hydroperoxide enabled a clear discrimination between samples. As can be seen in **Table 2**, immediately after treatments 300 MPa-treated samples presented lower ( $P < 0.05$ ) hydroperoxide value and higher TBARS and hexanal content compared to that of UHPH samples treated at 200 MPa and PA milk. The lower hydroperoxide value in combination with the higher levels of TBARS and hexanal in 300 MPa milk samples indicates the progression of oxidation from a primary to a secondary state. The present results showed that 300 MPa treatments resulted in emulsions that were less stable against lipid oxidation compared to 200 MPa treatments, which could be attributed to various factors. On the one hand, O'Brien and O'Connor (24) reported that heat treatment promotes the formation of alkyl radicals, which are extremely reactive and can propagate the lipid oxidation reaction. During UHPH treatment at 300 MPa, milk achieved temperatures around 100 °C, which could explain the difference in lipid oxidation between these samples and 200 MPa and PA milk. On the other hand, homogenized milk has been reported to be less susceptible to oxidation than raw milk because after homogenization, the new

**Table 2.** Means  $\pm$  Standard Deviation of Hydroperoxide (Absorbance Value), Malondialdehyde ( $\mu\text{g}$  MDA/mL Milk) and Hexanal (ppb) Content in Raw, Ultra-High-Pressure Homogenized (200 MPa 30 °C, 200 MPa 40 °C, 300 MPa 30 °C, and 300 MPa 40 °C), and High-Pasteurized Milk Samples during Refrigerated Storage at 4 °C<sup>a</sup>

	day	treatment					
		raw	200 MPa 30 °C	300 MPa 30 °C	200 MPa 40 °C	300 MPa 40 °C	PA <sup>b</sup>
hydroperoxide (Abs)	1	0.068 a $\pm$ 0.004	0.055 b $\pm$ 0.005	0.039 c $\pm$ 0.003	0.049 b $\pm$ 0.007	0.035 c $\pm$ 0.006	0.055 b $\pm$ 0.005
	18		0.051 a $\pm$ 0.008	0.038 b $\pm$ 0.001	0.051 a $\pm$ 0.007	0.035 b $\pm$ 0.006	0.051 a $\pm$ 0.006
TBARS ( $\mu\text{g}$ MDA/mL)	1	0.0105 b $\pm$ 0.0004	0.0114 b $\pm$ 0.0006	0.0132 a $\pm$ 0.0003	0.0116 b $\pm$ 0.0004	0.0139 a $\pm$ 0.0015	0.0106 b $\pm$ 0.0002
	18		0.0119 b $\pm$ 0.0002	0.0134 a $\pm$ 0.0002	0.0119 b $\pm$ 0.0004	0.0135 a $\pm$ 0.0002	0.0107 b $\pm$ 0.0001
hexanal (ppb)	1	2.175 b $\pm$ 0.74	5.102 b $\pm$ 2.244	15.347 a $\pm$ 8.205	6.386 b $\pm$ 2.859	15.844 a $\pm$ 6.921	2.460 b $\pm$ 0.615
	18		5.985 b,c $\pm$ 3.298	10.239 a,b $\pm$ 0.87	4.601 b,c $\pm$ 1.233	12.844 a $\pm$ 7.871	2.211 c $\pm$ 0.283

<sup>a</sup> Different letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). <sup>b</sup> PA = High-pasteurized milk (90 °C for 15 s).

milk fat droplets are resurfaced with casein and also because phospholipids from the MFGM, which are highly unsaturated, are partially transferred to the aqueous phase (25, 26). However, in this work, samples with the most intense homogenization treatment (300 MPa) suffered more secondary oxidation. This contradictory result could be related to the presence of clusters of fat droplets that were observed by different authors at pressures over 200 MPa (9, 13, 16). Hayes et al. (13) suggested that at higher pressures there would be more exposed fat interface. The amount of casein may become limiting, resulting in insufficiently covered fat droplets that can aggregate. If the milk fat droplet is not completely protected by proteins, it could be more accessible to oxidation. Caseins have been shown to possess significant antioxidant activity, which may be related to their hydrophobic nature and orientation of potential antioxidant side chains at the lipid interface; however, they can also bind prooxidant metals to phosphoserine residues (24). Probably, the presence of protective caseins at the surface of the tiny fat globules of 200 MPa milk samples is the reason why less oxidation was produced compared to that of 300 MPa samples, in spite of the higher amounts of free unsaturated oleic and linoleic acids present at 200 MPa (Table 1).

Aldehydes are common secondary oxidation products in milk, with flavor thresholds generally lower than those of alcohols and ketones, and for that reason, they have a large impact on milk flavor when present at concentrations over the flavor threshold. Although hexanal content in 300 MPa samples was around 15 ppb compared to 5 ppb in 200 MPa samples and 2 ppb in PA milk, the flavor threshold value of this compound in homogenized milk is 0.049 ppm (27); hence, it should not necessarily be related directly as a flavor problem. During storage, in general no changes in the oxidation degree of milk samples were observed, although a small, but not significant, increase in TBARS value was observed at the end of storage. Mean TBARS quantities were around 10–11  $\mu\text{g}/\text{L}$  milk in 200 MPa and PA milk and around 13  $\mu\text{g}/\text{L}$  milk in 300 MPa samples. These values are higher than those found by Fenaille et al. (28) in UHT (4  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) and pasteurized (8  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) milk types; however, techniques used to determine MDA were different. It must be taken into account that although results from our TBA analysis are expressed as  $\mu\text{g}$  MDA/ mL milk, besides the aldehydes, MDA included other substances such as ketones, ketosteroids, acids, esters, sugars, imides and amides, amino acids, oxidized proteins, pyridines, and pyrimidines can react with the TBA (TBARS) (22), whereas mass spectrometry used by Fenaille et al. (28) enables good selectivity to characterize and quantify MDA. In a previous work, Pereda et al. (23) characterized the profile of volatile compounds of UHPH-treated samples, and they observed an increase in 2-heptanone and 2-nonanone in milk samples during storage. These ketones can

be formed during heat treatment by  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids followed by decarboxylation or by decarboxylation of  $\beta$ -ketoacids present in milk fat (29), and hence, they can interfere in TBA results.

In conclusion the results of this study clearly show that whereas lipolysis was produced in samples treated at 200 MPa, oxidation took place in samples treated at 300 MPa. Nevertheless, a sensory analysis will be carried out in order to confirm whether the concentration of hexanal in 300 MPa samples and the increase of FFA in 200 MPa and 40 °C are perceived by consumers.

#### ABBREVIATIONS USED

UHPH, ultra-high-pressure homogenization; PA, high-pasteurized milk; Ti, inlet temperature; FFA, free fatty acids; MFGM, milk fat globule membrane; LPL, lipoprotein lipase; MDA, malondialdehyde; TBA, thiobarbituric acid; TBRAS, TBA reacting substances; SCFFA, short-chain free fatty acids; MCFFA, medium-chain free fatty acids; LCFFA, long-chain free fatty acids.

#### LITERATURE CITED

- (1) Ma, Y.; Ryan, C.; Barbano, D. M.; Galton, D. M.; Rudan, M. A.; Boor, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 264–274.
- (2) Deeth, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 555–562.
- (3) Duncan, S. E.; Christen, G. L. Sensory detection and recovery by acid degree value of fatty acids added to milk. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 2855–2859.
- (4) Deeth, H. C.; Fitz-Gerald, C. H. Lipolytic Enzymes and Hydrolytic Rancidity. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd ed.; Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds.; Springer: New York, 2006, pp 481–554.
- (5) O'Connor, T. P.; O'Brien, N. M. Lipolytic Enzymes and Hydrolytic Rancidity. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd ed.; Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds.; Springer: New York, 2006, pp 557–600.
- (6) Stapelfeldt, H.; Nielsen, K. N.; Jensen, S. K.; Skibsted, L. H. Free radical formation in freeze-dried raw milk in relation to its a-tocopherol level. *J. Dairy Res.* **1999**, *66*, 461–466.
- (7) Nursten, H. E. Heat-Induced Changes in the Flavour of Milk. In *Heat-Induced Changes in Milk*, 2nd ed.; International Dairy Federation; Belgium, Brussels, 1995, pp308–317.
- (8) Flourey, J.; Bellettre, J.; Legrand, J.; Desrumaux, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 843–853.
- (9) Pereda, J.; Ferragut, V.; Quevedo, J. M.; Guamis, B.; Trujillo, A. J. Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 1081–1093.

- (10) Zamora, A.; Ferragut, V.; Jaramillo, P. D.; Guamis, B.; Trujillo, A. Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization on the Cheese-Making properties of milk. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 13–23.
- (11) Serra, M.; Trujillo, A. J.; Quevedo, J. M.; Guamis, B.; Ferragut, V. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 782–790.
- (12) Pereda, J.; Ferragut, V.; Guamis, B.; Trujillo, A. Effect of ultra-high-pressure homogenisation on natural-occurring micro-organisms in bovine milk. *Milchwissenschaft.* **2006**, *61*, 245–248.
- (13) Hayes, M. G.; Fox, P. F.; Kelly, A. L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 25–33.
- (14) Hayes, M. G.; Kelly, A. L. High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *J. Dairy Res.* **2003**, *70*, 307–313.
- (15) Hayes, M. G.; Kelly, A. L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *J. Dairy Res.* **2003**, *70*, 297–305.
- (16) Thiebaut, M.; Dumay, E.; Picart, L.; Guiraud, J. P.; Cheftel, J. C. High pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 427–439.
- (17) McClements, D. J.; Decker, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1270–1282.
- (18) Sorensen, A. M.; Baron, C. P.; Let, M. B.; Bruggemann, D. A.; Pedersen, L. R. L.; Jacobsen, C. Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Oxidation linked to changes in protein composition at the oil-water interface. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1781–1789.
- (19) Datta, N.; Hayes, M. G.; Deeth, H. C.; Kelly, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 1–7.
- (20) de Jong, C.; Badings, H. T. Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 94–98.
- (21) Ostdal, H.; Andersen, H. J.; Nielsen, J. H. Antioxidative activity of urate in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5588–5592.
- (22) Fenaille, F.; Mottier, P.; Turesky, R. J.; Ali, S.; Guy, P. A. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J. Chromatogr., A.* **2001**, *921*, 237–245.
- (23) Pereda, J.; Jaramillo, P. D.; Quevedo, J. M.; Ferragut, V.; Guamis, B.; Trujillo, A. J. Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 826–834.
- (24) O'Brien, N. M.; O'Connor, T. P. Lipid Oxidation. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Elsevier Publishers Ltd.: New York, 2002; pp 1600–1604.
- (25) Dunkley, W. L.; Franklin, J. D.; Pangborn, R. M. Influence of homogenization, copper and ascorbic acid on light/activated flavor in milk. *J. Dairy Sci.* **1962**, *45*, 1040–1044.
- (26) Huppertz, T.; Kelly, A. L. Physical Chemistry of Milk Fat Globules. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd ed.; Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds.; Springer: New York, 2006, pp 173–212.
- (27) Day, E. A.; Lillard, D. A.; Montgomery, M. W. Autoxidation of milk lipids. III. Effect on flavor of the additive interactions of carbonyl compounds at subthreshold concentrations. *J. Dairy Sci.* **1963**, *46*, 291–294.
- (28) Fenaille, F.; Parisoda, V.; Visani, P.; Populaire, S.; Tabet, J.-C.; Guy, P. A. Modifications of milk constituents during processing: a preliminary benchmarking study. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 728–739.
- (29) Calvo, M. M.; de la Hoz, L. Flavour of Heated milks. A review. *Int. Dairy J.* **1992**, *2*, 69–81.

---

Received for review March 28, 2008. Revised manuscript received June 6, 2008. Accepted June 9, 2008. We acknowledge the European Union for the financial support given to this investigation (CRAFT project 512626), and Julieta Pereda acknowledges a predoctoral fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR).

JF800972M

# **SECCIÓN IV**

---

**Resultados y discusión**





---

## 4. Resultados y discusión

En esta sección se pretende realizar una breve discusión de los principales efectos producidos por la UHPH sobre los componentes de la leche y compararlos con los efectos producidos por un tratamiento térmico convencional, completando con algunos datos que no han sido incluidos en las publicaciones.

Las leches que se utilizaron fueron obtenidas de una granja local ubicada en Can Badó (Barcelona, España) y tuvieron una composición de  $11,6 \pm 1$  % de sólidos totales,  $3,29 \pm 0,03$  % de proteína y  $3,9 \pm 0,2$  % de grasa. Previamente a la realización de los tratamientos tecnológicos correspondientes las leches fueron estandarizadas en 3,5 % de grasa y refrigeradas a 4°C por 24 h.

En primer lugar se llevaron a cabo pruebas preliminares en las que se probó un intervalo de presiones de 100 a 300 MPa (simple y doble etapa) con temperaturas de entrada de 30 y 40°C, y sobre dichas muestras se realizaron estudios microbiológicos con el fin de determinar las condiciones más propicias para obtener una reducción microbiana aceptable para una leche destinada al consumo humano.

Una vez seleccionadas las condiciones UHPH y la muestra a ser utilizada como control dichas muestras de leche se produjeron por triplicado utilizando tres partidas diferentes de leche cruda con el fin de evaluar el potencial de la tecnología UHPH como alternativa al tratamiento térmico para la obtención de leche de consumo. Para ello se realizó un almacenamiento de las muestras tratadas en condiciones de refrigeración a 4°C con el fin de estudiar las características microbiológicas, fisicoquímicas, los cambios proteolíticos, lipolíticos y de oxidación, caracterizar el perfil de compuestos volátiles, estudiar la formación de compuestos asociados con el tratamiento térmico y realizar una evaluación sensorial.

### 4.1 Pruebas preliminares

En la Tabla 6 se pueden observar los recuentos microbiológicos obtenidos junto con la temperatura máxima alcanzada en el equipo para las distintas muestras tratadas por UHPH (simple y doble etapa).

**Tabla 6:** Recuentos microbiológicos (log cfu/mL) de leche cruda y leches tratadas por UHPH.

Tratamiento	Recuento total	Psicrótrofos	Coliformes	Lactococos	Lactobacilos	Enterococos	T2 (°C)
Cruda	5,4 <sup>a</sup> ± 0,7	5,3 <sup>a</sup> ± 0,8	4,2 <sup>a</sup> ± 1,0	5,2 <sup>a</sup> ± 0,7	3,2 <sup>a</sup> ± 1,0	4,0 <sup>a</sup> ± 1,0	
Ti = 30 °C							
200 MPa	1,5 <sup>b</sup> ± 0,3	0,4 <sup>b</sup> ± 0,5	ND <sup>c</sup>	1,2 <sup>b</sup> ± 0,5	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	79,0 ± 3,2
230 MPa	1,3 <sup>b</sup> ± 0,2	0,6 <sup>b</sup> ± 0,2	ND <sup>c</sup>	1,1 <sup>b</sup> ± 0,1	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	80,0 ± 1,0
300 MPa	1,2 <sup>b</sup> ± 0,4	0,2 <sup>b</sup> ± 0,2	ND <sup>c</sup>	1,1 <sup>b</sup> ± 0,5	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	94,0 ± 3,4
330 MPa	0,9 <sup>b</sup> ± 0,2	0,7 <sup>b</sup> ± 0,1	ND <sup>c</sup>	1,3 <sup>b</sup> ± 0,1	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	90,8 ± 2,1
Ti = 40 °C							
100 MPa	4,4 <sup>a</sup> ± 0,5	4,2 <sup>a</sup> ± 0,6	1,0 <sup>b</sup> ± 0,2	4,2 <sup>a</sup> ± 0,7	1,0 <sup>b</sup> ± 0,2	1,0 <sup>b</sup> ± 0,2	62,7 ± 0,6
200 MPa	1,2 <sup>b</sup> ± 0,5	0,4 <sup>b</sup> ± 0,5	ND <sup>c</sup>	1,1 <sup>b</sup> ± 0,6	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	83,6 ± 2,3
230 MPa	1,0 <sup>b</sup> ± 0,2	0,3 <sup>b</sup> ± 0,1	ND <sup>c</sup>	1,0 <sup>b</sup> ± 0,2	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	80,3 ± 1,2
300 MPa	1,2 <sup>b</sup> ± 0,4	0,5 <sup>b</sup> ± 0,6	ND <sup>c</sup>	1,0 <sup>b</sup> ± 0,5	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	99,6 ± 1,5
330 MPa	1,1 <sup>b</sup> ± 0,2	0,5 <sup>b</sup> ± 0,1	ND <sup>c</sup>	1,2 <sup>b</sup> ± 0,2	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	95,3 ± 1,2

<sup>a,b,c</sup> Diferentes superíndices entre muestras dentro de una misma columna indican diferencia significativa (P < 0,05).

ND = no detectado

T2 = Temperatura alcanzada luego de la válvula de alta presión homogenización.

Ti = Temperatura de entrada de la muestra en el equipo de alta presión homogenización.

El tratamiento a 100 MPa con temperatura de entrada 40°C no logró reducir los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, psicrótrofos o de lactococos de manera significativa respecto a la leche cruda e incluso la reducción alcanzada estuvo muy próxima al límite considerado como aceptable para leches pasteurizadas ( $1 \times 10^5$  ufc/mL). En cuanto a los coliformes, cuya presencia indica condiciones higiénicas deficientes, 100 MPa no fue una presión suficiente para eliminarlos completamente como ocurrió en el caso de las muestras tratadas a 200 y 300 MPa. En ninguna muestra de leche cruda se detectó la presencia de *Salmonella* spp. o *Listeria monocytogenes* por lo que no se pudo concluir sobre la eficacia de la UHPH sobre la destrucción de microorganismos patógenos. Sin embargo, en los estudios realizados en nuestros laboratorios por Briñez *et al.* (2006b; 2006c) en los que se inocularon dos cepas diferentes de *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 10536 y *E. coli* O157:H7 CCUG 44857) y *Listeria innocua* en leche que fue tratada a 330 MPa (etapa doble) y Ti = 20°C, se obtuvieron valores de letalidad de 4,3, 3,94 y 4,31 log, respectivamente.

Algunos autores (Hayes *et al.*, 2005; Thiebaud *et al.*, 2003) han descrito que la reducción de aerobios mesófilos es dependiente de la presión mejorándose la inactivación a medida que la presión aumenta. Sin embargo, en los resultados aquí obtenidos el efecto de la presión sólo ha sido notable entre 100 y 200 MPa. A presiones

superiores a 200 MPa no se detectaron diferencias significativas entre los recuentos de las muestras tratadas a 200 o 300 MPa. Se han sugerido como posibles mecanismos responsables de la inactivación microbiana la repentina caída de presión, fuerzas de corte y de torsión, turbulencia y la cavitación (Middelberg, 1995), aunque el incremento de temperatura ocasionado durante el pase del fluido por la válvula de alta presión también puede tener un papel importante. Por lo tanto, la diferencia entre 100 y 200 MPa, probablemente no sea debida exclusivamente al incremento de la presión sino también al incremento de la temperatura máxima alcanzada ( $T_2$ ) la cual a 100 MPa fue sólo de  $\sim 63^\circ\text{C}$ . Esta baja temperatura combinada con el tiempo tan reducido durante el cual el fluido es mantenido a la máxima temperatura,  $< 0,7$  s en nuestro equipo, seguramente fueron insuficientes para lograr obtener una reducción microbiana aceptable.

Por otro lado, también se ha demostrado en otros estudios previos que la aplicación de una segunda etapa tiene un mayor efecto sobre la destrucción microbiana que la aplicación de una etapa simple (Hayes y Kelly, 2003b). Sin embargo, en las condiciones aquí ensayadas de presión y temperatura no se han observado mejoras en la reducción de los diferentes grupos microbianos entre un tratamiento efectuado en etapa simple y el equivalente en etapa doble.

Es importante tener en cuenta que la comparación de datos obtenidos en experimentos llevados a cabo con diferentes equipos debe ser analizada cuidadosamente ya que las diferencias en la válvula utilizada, en el diseño del equipo, así como en la temperatura de entrada y el tiempo durante el cual la leche permanece a la temperatura máxima pueden conducir a diferentes resultados.

Teniendo en consideración únicamente los datos microbiológicos obtenidos en estas pruebas preliminares, se determinó que las condiciones de presión y temperatura a utilizar para evaluar la posible utilización de la tecnología UHPH como alternativa al tratamiento térmico serían 200 y 300 MPa con temperatura de entrada de 30 y  $40^\circ\text{C}$ . En base a las temperaturas máximas alcanzadas en dichos tratamientos se optó por utilizar como control una muestra tratada por alta pasteurización (PA;  $90^\circ\text{C}$  y 15 s).

## 4.2 Potencial de la tecnología UHPH como alternativa al tratamiento térmico

### 4.2.1 Reducción microbiana

La calidad microbiológica de las leches PA y UHPH tras los tratamientos y durante la vida útil de la leche en condiciones de refrigeración a 4°C se describen en los artículos 1 y 2 de la sección III (Pereda, Ferragut, Guamis y Trujillo, 2006; Pereda, Ferragut, Quevedo, Guamis y Trujillo, 2007).

Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales en la leche cruda oscilaron entre  $2,5 \times 10^4$  y  $9 \times 10^6$  ufc/mL, los cuales se redujeron entre 3 y 4 ciclos logarítmicos en las leches PA y UHPH. La gran variación en el recuento total de la leche cruda de partida nos permitió estudiar la eficiencia de la UHPH, ya que independientemente de la carga microbiana inicial, la tecnología UHPH resultó ser tan efectiva como el tratamiento de alta pasteurización (99,9 % de reducción). Tras los tratamientos de pasteurización o alta presión homogenización, tanto los psicrótrofos como los lactococos presentaron un comportamiento similar a los mesófilos totales siendo inicialmente reducidos en unas 3,5 unidades logarítmicas, las esporas fueron reducidas en aproximadamente 1 unidad logarítmica, mientras que los coliformes, lactobacilos, enterococos y *Pseudomonas* spp. no pudieron ser detectados. Estos valores demuestran que el tratamiento UHPH aplicado a la leche fue capaz de reducir la microbiota de la leche de manera similar al tratamiento de alta pasteurización.

A partir del día 14 del almacenamiento de la leche a 4°C se comenzó a detectar un crecimiento microbiano, sobre todo de psicrótrofos, mesófilos totales y lactococos. El recuento de psicrótrofos para todas las leches excepto la tratada a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  superó el valor límite de  $5 \times 10^5$  ufc/mL establecido por la normativa europea vigente en el momento en el cual se comenzó a desarrollar esta tesis (Directiva Europea 92/46/EEC, 1992) entre el día 14 y 18 de almacenamiento. En la actualidad, la normativa europea relativa a los criterios microbiológicos aplicable a los productos alimenticios se ha modificado y el nuevo Reglamento (CE) n° 2073/2005 contempla fundamentalmente criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos. Dicha normativa establece que una leche tratada térmicamente es aceptable siempre y cuando haya ausencia de *L. monocytogenes* y la presencia de enterobacterias sea menor a 5 ufc/mL, sin considerar los recuentos de microorganismos alterantes como los psicrótrofos u otros. Sin embargo, a pesar de este cambio de normativa, consideramos

que la determinación de la vida útil en función de los recuentos microbiológicos realizados es fundamental ya que los microorganismos causantes de deterioro pueden afectar la calidad del producto y consecuentemente la aceptabilidad por parte del consumidor. La mayor vida útil desde el punto de vista microbiológico detectada en el caso de la muestra tratada a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  podría estar asociada a la inactivación parcial de la lactoperoxidasa (ver sección 4.2.3), componente principal del sistema antimicrobiano lactoperoxidasa en la leche natural.

Los recuentos en lactococos, coliformes y lactobacilos permanecieron debajo del límite de detección hasta el final del almacenamiento en todas las muestras. En el caso de *Pseudomonas* spp., a pesar de que tras los tratamientos UHPH no se habían detectado en ninguna muestra, su presencia se detectó al día 18 de almacenamiento en las muestras tratadas a 200 y 300 MPa con  $T_i = 40^\circ\text{C}$ .

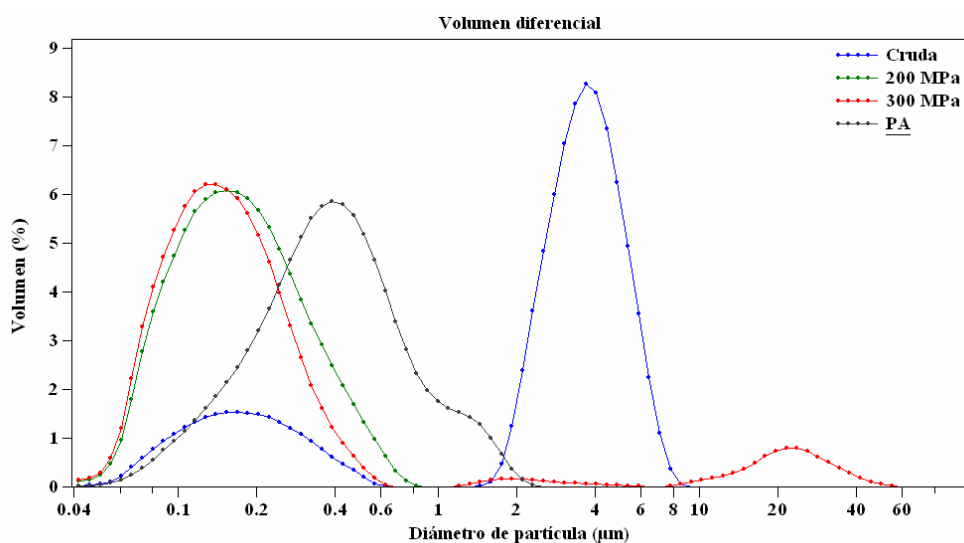
Hasta el momento existe únicamente un estudio previo en el cual se ha estudiado la evolución microbiana de leche tratada por UHPH a 200 y 250 MPa con  $T_i = 55^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$  en el cual a pesar de utilizar una  $T_i$  mayor que en nuestro estudio (lo cual indica una mayor temperatura máxima alcanzada tras la válvula) los recuentos microbianos de mesófilos y psicrótrofos superaron el límite microbiológico recomendado como aceptable al día 7, mientras que los coliformes alcanzaron un valor de 50 ufc/mL al día 4 de almacenamiento (Smiddy *et al.*, 2007). A partir de estos resultados los autores sugirieron que no es posible la utilización de la UHPH como alternativa al tratamiento de pasteurización a no ser que se utilicen condiciones más severas. Sin embargo, nuestros resultados han demostrado que la tecnología UHPH es tan eficiente como el tratamiento de PA en la reducción de la microbiota de la leche. Probablemente los elevados recuentos obtenidos por este grupo de investigadores se deban a las pobres condiciones higiénicas utilizadas durante la manipulación y almacenamiento de la leche ya que inmediatamente después del tratamiento ningún grupo microbiano de los estudiados había sido detectado.

#### **4.2.2 Estabilidad física del glóbulo graso**

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, durante el tratamiento tecnológico de homogenización el glóbulo graso nativo se rompe y se forman nuevos glóbulos más pequeños de mayor área superficial que estarían cubiertos por una nueva membrana y que evitarían el desnatado y la coalescencia durante el almacenamiento de la leche.

Con el objetivo de evaluar el efecto producido por la UHPH sobre el glóbulo graso, se analizó el tamaño de partícula mediante difracción láser detallada en el artículo 2 incluido en la sección III (Pereda *et al.*, 2007).

Tal como se puede observar en la Figura 6 la curva de distribución de tamaño de partícula de la leche cruda mostró un pico principal a 3,7  $\mu\text{m}$  que corresponde a los glóbulos grasos y un pequeño pico a 0,2  $\mu\text{m}$  que corresponde a las micelas de caseína. Las curvas de distribución de tamaño para las leches tratadas a 200 MPa a ambas Ti y para la leche PA mostraron un único pico que presentó un valor medio de 0,13  $\mu\text{m}$  y  $\sim 0,4 \mu\text{m}$  para las muestras tratadas a 200 MPa y PA, respectivamente. El incremento de la presión hasta 300 MPa causó la aparición de un segundo pico a diámetros mayores relacionado con la formación de agregados, lo cual se vio reflejado en un incremento del valor  $d_{4,3}$  el cual es un parámetro muy sensible a la presencia de pequeñas cantidades de grandes partículas. Dichos agregados representaron  $< 10\%$  del volumen total de partículas.



**Figura 6:** Distribución de tamaño de partícula tipo de muestras de leche cruda, UHPH (200 y 300 MPa con  $T_i = 30^\circ\text{C}$ ) y de pasteurización alta (PA)

Se han propuesto varias causas relacionadas con la formación de estos agregados. Flourey *et al.* (2000) sugirieron que a 300 MPa las proteínas del suero pueden estar muy desnaturizadas como para estabilizar los pequeños glóbulos formados, y por

otro lado, Hayes *et al.* (2005) mencionaron que a elevadas presiones es posible que la cantidad de caseína disponible sea limitante para cubrir los nuevos glóbulos formados resultando en glóbulos grasos insuficientemente cubiertos, los cuales pueden sufrir coalescencia al colisionar entre sí. Además de poder ser formados a través de la coalescencia de glóbulos parcialmente cubiertos, los agregados también pueden generarse al compartir el componente proteico adsorbido sobre la superficie (Thiebaud *et al.*, 2003). Durante el tratamiento UHPH las micelas de caseína y las proteínas del suero pueden sufrir modificaciones en su estructura (disociación, desplegamiento o desnaturalización) que pueden conducir a que los glóbulos se unan entre sí compartiendo el material proteico de la superficie.

El hecho de que en el presente trabajo no haya habido diferencias entre muestras UHPH tratadas a 200 y 300 MPa en cuanto a la desnaturalización de las proteínas del suero (ver sección 4.2.8) ni en cuanto a la hidrólisis de las diferentes caseínas estudiadas mediante la técnica de electroforesis capilar (ver sección 4.2.5), ni se haya observado desnatado espontáneo en las muestras de 300 MPa durante el almacenamiento a 4°C a pesar de los agregados formados (artículo 2, Sección III, Pereda *et al.*, 2007), indica que probablemente la hipótesis de Thiebaud *et al.* (2003) basada en la formación de agregados en base a compartir material proteico y no en la coalescencia de glóbulos grasos, sea la más adecuada. En la leche PA se observó una ligera separación espontánea de grasa (0,5 %) durante el almacenamiento probablemente debido al tamaño de glóbulo más grande en comparación con las leches UHPH, mostrando estas últimas una mejor estabilidad al almacenamiento en frío. Los procesos de separación espontánea de grasa y sedimentación son de gran importancia en leches de larga vida útil donde se da tiempo suficiente para que ocurran. Dichos procesos físicos dependen fuertemente del tamaño de las partículas y de la diferencia de densidad entre las partículas y el suero lácteo y en leches homogenizadas y tratadas térmicamente conducen a la formación de una capa superficial que además de grasa contiene una alta concentración de proteínas y a una capa de sedimento que además de proteína contiene una alta concentración de grasa (Nieuwenhuijse y van Boekel, 2006). La menor separación de grasa observada en las leches UHPH frente a una leche PA sugiere que la UHPH sería un buen método alternativo a la homogenización convencional en la producción de leches de larga duración (UHT y esterilización en botella) con mejores características de estabilidad frente al desnatado.



### 4.2.3 Activación / Inactivación de enzimas

La inactivación enzimática ha sido estudiada en los artículos 4 y 2 de la sección III (Pereda, Ferragut, Buffa, Guamis y Trujillo, 2008b; Pereda *et al.*, 2007). El efecto de la aplicación de la UHPH sobre la inactivación enzimática varió dependiendo de la enzima estudiada. La fosfatasa alcalina, como era de esperar y dadas las temperaturas alcanzadas ( $> 78^{\circ}\text{C}$ ) en las condiciones de presión y Ti estudiadas, fue completamente inactivada por todos los tratamientos UHPH así como por el tratamiento PA. Estudios llevados a cabo por Datta *et al.* (2005) y por Picart *et al.* (2006) han mostrado que la enzima se inactiva a temperaturas mayores a  $60^{\circ}\text{C}$ .

Dentro de las enzimas antimicrobianas la lactoperoxidasa es la más representativa. La completa inactivación obtenida en la leche PA concuerda con que esta enzima es utilizada como indicador de alta pasteurización. La LP fue completamente inactivada o casi completamente inactivada en todos los tratamientos UHPH, excepto en el tratamiento de 200 MPa y  $T_i = 30^{\circ}\text{C}$  donde sólo se inactivó un 65%. Como se ha explicado anteriormente al hablar de la reducción microbiana, la actividad residual de esta enzima en las condiciones antes mencionadas probablemente contribuyó a la mayor vida útil detectada en esta muestra.

En ninguno de los tratamientos estudiados la plasmina pudo ser totalmente inactivada por lo que su actividad residual deberá ser considerada como posible agente contribuyente en la proteólisis de las leches. Al comparar la plasmina y su zimógeno (plasminógeno), este último presentó mayor sensibilidad a los tratamientos aplicados, mientras que respecto a la plasmina, un 70% fue inactivada en los tratamientos a 300 MPa y sólo un 45% a 200 MPa. Durante el almacenamiento de las leches, especialmente leches de larga duración como la UHT, se pueden producir cambios en sus partículas debido a fenómenos de proteólisis o agregación, los que pueden dar como resultado la formación de un gel. Harwalkar (1992) definió el proceso de gelación como aquel proceso caracterizado por la pérdida de fluidez del producto causado por cambios producidos durante el almacenamiento. Sin embargo, algunos autores han usado los términos “coagulación” o “desestabilización” para describir la inestabilidad. Las causas de gelación en leches UHT se atribuyen principalmente a dos factores: (1) proteasas termoestables procedentes de microorganismos psicrótrofos que hidrolizan la  $\kappa$ -caseína por un mecanismo similar al seguido por el cuajo conduciendo al gel correspondiente (Nieuwenhuijse y van Boekel, 2006) y (2) a la plasmina. Esta enzima resiste parcialmente los tratamientos UHT y es capaz de hidrolizar principalmente la  $\beta$ - y  $\alpha_{s2}$ -

caseína y más lentamente la  $\alpha_{s1}$ -caseína produciendo una serie de polipéptidos que al agregarse forman un gel débil, transparente y fácilmente redispersable (Bastian y Brown, 1996). En un estudio llevado a cabo por Hayes *et al.* (Hayes *et al.*, 2005) se evaluó el efecto de la UHPH en un intervalo de presiones de 50 - 250 MPa y  $T_i = 45^\circ\text{C}$  sobre la inactivación de la plasmina y proteasas extracelulares de *Pseudomonas fluorescens*, siendo estas últimas muy estables al tratamiento térmico. En dicho trabajo se alcanzó un 85 y 95% de inactivación de la plasmina y un 20 y 30% de inactivación de las proteasas microbianas a 150 y 250 MPa, respectivamente. Estos resultados sugieren la posible utilización de esta tecnología como sustituto de la homogenización convencional para evitar o retrasar el proceso de gelación en la leche UHT y consecuentemente prolongar su vida útil.

En la literatura existente se dan discrepancias en cuanto al fenómeno de inactivación de enzimas mediante la tecnología UHPH. La inactivación puede deberse fundamentalmente a dos factores: el incremento de temperatura y las fuerzas a las cuales la leche es sometida al pasar por la válvula de alta presión. La fosfatasa alcalina se encuentra en la MFGM y la plasmina en las micelas de caseína. Debido a la reducción del tamaño del glóbulo graso y a la hidrólisis de las caseínas producidos en los tratamientos UHPH podría intuirse que en la inactivación de dichas enzimas por UHPH posiblemente intervengan ambos factores, es decir, tanto el efecto de la temperatura como las fuerzas mecánicas.

#### 4.2.4 Apariencia física

El análisis instrumental de color utilizando las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (artículo 2, sección III, Pereda *et al.*, 2007), mostró que el tratamiento de homogenización tanto convencional como de ultra alta presión condujo a leches más blancas, reflejado en un mayor valor  $L^*$ , en comparación con la leche cruda. Sin embargo, la leche PA resultó ser significativamente más blanca que las leches UHPH. Hayes y Kelly (2003b) observaron una disminución del 5% en el tamaño de las micelas a presiones de 200 MPa. Dicha disminución implica un aumento del número de pequeñas partículas que puede ser el responsable del descenso de la luminosidad ( $L^*$ ) en la leche (O'Sullivan, Kelly y Fox, 2002). La ausencia de diferencias en el valor  $L^*$  entre muestras tratadas a 200 y 300 MPa sugiere que la desintegración micelar generada por el tratamiento UHPH no fue mayor al elevar la presión de 200 a 300 MPa. Un estudio reciente realizado por Roach y Harte (2008) muestra una disminución del tamaño de la micela en

leche desnatada trabajando a presiones de 100 a 200 MPa, sin embargo, a 300 MPa no se alcanzó mayor reducción en el tamaño de la micela sino que se observó un ligero incremento. Sus resultados indican que el aumento del tamaño de las micelas a 300 MPa tiene origen a causa de un proceso de reagrupación de submicelas una vez que la presión es liberada debido al aumento de exposición de sitios hidrofóbicos de las submicelas producido por el tratamiento UHPH. Según Johnston, Austin y Murphy (1992) la exposición de sitios hidrofóbicos bajo presión hidrostática comienza a incrementar por encima de los 200 MPa.

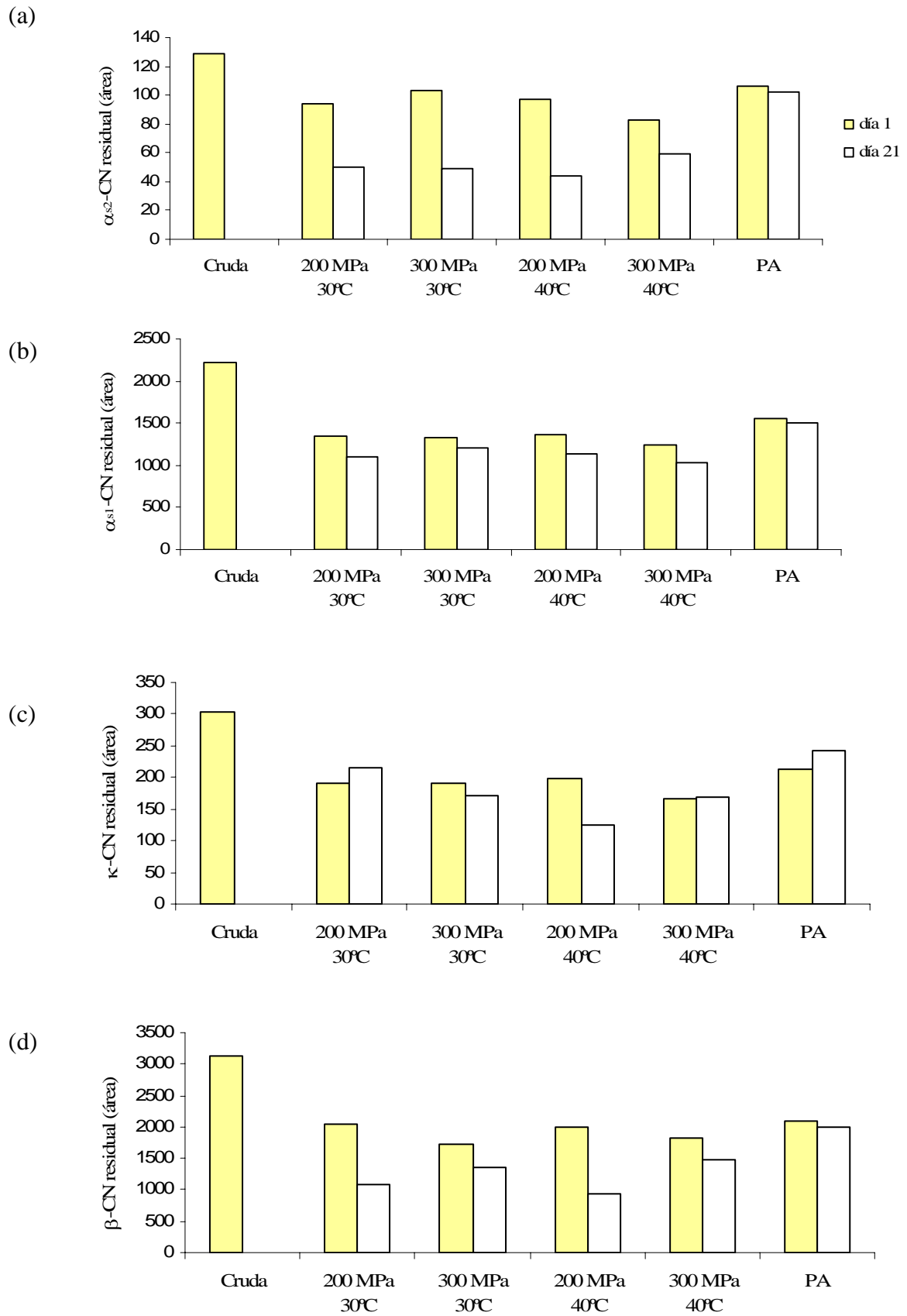
La viscosidad de las muestras tratadas a 200 MPa fue menor ( $P < 0,05$ ) comparada con la leche PA y las UHPH tratadas a 300 MPa (artículo 2, sección III, Pereda *et al.*, 2007). La formación de agregados a 300 MPa podría ser la explicación de la mayor viscosidad en estas leches.

Durante el almacenamiento a 4°C no se detectaron cambios importantes en cuanto al color de las muestras, pero sí se observó un incremento de la viscosidad en todas las muestras pero siempre manteniéndose la tendencia de que las muestras tratadas a 200 MPa presentaron la menor viscosidad.

#### **4.2.5 Proteólisis**

Tal como se describe en el artículo 4 de la sección III (Pereda *et al.*, 2008b) el grado de proteólisis se evaluó en la fracción insoluble a pH 4,6 (cuantificación de caseínas residuales por electroforesis capilar) y en la fracción soluble a pH 4,6 mediante el análisis cromatográfico del perfil peptídico y mediante la determinación del nitrógeno soluble y de los aminoácidos libres totales.

Globalmente el perfil electroforético de la fracción insoluble a pH 4,6 fue similar en todas las leches. Inmediatamente tras los respectivos tratamientos tecnológicos las muestras no presentaron diferencias en cuanto a la hidrólisis de las diferentes caseínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$  -,  $\kappa$ - y  $\beta$ -caseína). La caseína  $\alpha_{s2}$  fue la que presentó la menor degradación (16 - 36%) mientras que en el resto de las caseínas la degradación producida osciló entre 30 - 45 % (Figura 7). A lo largo del almacenamiento las áreas de los picos correspondientes a las caseínas  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  disminuyeron en mayor proporción que los picos correspondientes a la  $\alpha_{s1}$ - y  $\kappa$ -caseína lo cual puede explicarse ya que las caseínas  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  son los sustratos principales de la plasmina (Bastian y Brown, 1996).



**Figura 7:** Área de los picos residuales de las diferentes caseínas  $\alpha_{s1}$ - (a),  $\alpha_{s2}$ - (b),  $\kappa$ - (c) y  $\beta$ -caseína (d) para el día 1 y 21 de almacenamiento.

La menor hidrólisis de la  $\alpha_{s2}$ -caseína en la muestra tratada a 300 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$ , a pesar de tener el mismo contenido en plasmina que la muestra tratada a 300 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$ , pudo deberse a la formación de agregados antes mencionados. A pesar de que dichos agregados se formaron en ambas muestras, estos fueron más pronunciados a 40 que a  $30^\circ\text{C}$ . Si estos agregados son formados a través de glóbulos que comparten material proteico, es posible que las caseínas queden atrapadas entre varios glóbulos y por lo tanto el acceso de la enzima al sustrato sea más dificultoso.

La  $\beta$ -caseína, al igual que la  $\alpha_{s2}$ -caseína, es sustrato preferente de la plasmina pero también lo es de proteasas microbianas, mientras que la  $\alpha_{s1}$ - y la  $\kappa$ -caseína son más resistentes a la plasmina, aunque pueden ser hidrolizadas por la presencia en la leche de proteasas microbianas. La leche tratada a 200 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  mostró una mayor degradación ( $P < 0,05$ ) tanto de la  $\beta$ - como de la  $\kappa$ -CN respecto a las otras muestras UHPH posiblemente debido al mayor contenido de plasmina y a la presencia de *Pseudomonas* spp. (ver sección 4.2.1) que pudieron haber producido proteasas. El crecimiento de *Pseudomonas* spp. hacia el final del almacenamiento también se observó en la muestra tratada a 300 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$ , sin embargo, al igual que se explicó con la plasmina, probablemente los agregados pudieron dificultar el acceso de la enzima hacia la caseína.

Durante el almacenamiento la leche PA no sufrió más degradación que la obtenida a causa del tratamiento a pesar de tener el mismo contenido en plasmina que las leches tratadas a 300 MPa. Son varios los factores que podrían controlar la proteólisis en la leche tratada por UHPH. En primer lugar, en el presente trabajo hemos observado que la actividad de la plasmina es afectada por el tratamiento siendo su inactivación mayor a 300 que a 200 MPa. Sin embargo, la inactivación de la plasmina no sólo depende del tratamiento aplicado sino también de la presencia de  $\beta$ -Lg desnaturalizada ya que ésta puede complejarse con la enzima produciendo la pérdida de su actividad (Metwalli *et al.*, 1998). El mayor porcentaje de desnaturalización de la  $\beta$ -Lg detectado en la leche PA (47%) en comparación con las leches UHPH (35%) (ver sección 4.2.8) podría ser la explicación de la menor proteólisis detectada en la leche PA a pesar de tener el mismo contenido de plasmina que las muestras tratadas a 300 MPa. Por otro lado, la UHPH a presiones superiores a 200 MPa no sólo induce una menor desnaturalización de las proteínas del suero, especialmente de la  $\beta$ -Lg (Zamora *et al.*, 2007) sino también una mayor disminución del tamaño de las micelas (Hayes y Kelly,

2003b) en comparación con una leche pasteurizada y homogenizada. La disminución del tamaño de las micelas puede conducir a una mayor área superficial sobre la cual podrían actuar las proteasas, mientras que durante el proceso de reagrupación micelar, la  $\beta$ -Lg desnaturalizada podría formar enlaces disulfuro con las caseínas originando micelas de composición y/o estructura modificadas que podrían impedir o retrasar el acceso de las proteasas. Ambos fenómenos ayudan a explicar la mayor proteólisis observada en las muestras UHPH en comparación a la leche PA. Adicionalmente, la UHPH podría modificar la susceptibilidad de las proteínas mediante cambios en su conformación a través de los cuales se expondrían nuevos sitios activos susceptibles de ser hidrolizados por las proteasas.

En general, el perfil peptídico de la fracción soluble a pH 4,6 de todas las leches fue muy similar. La mayor diferencia cualitativa fue la aparición de dos picos de características hidrofóbicas con tiempos de retención de  $\sim 21,5$  y  $\sim 30,5$  min en las muestras tratadas a 200 y 300 MPa con  $T_i = 40^\circ\text{C}$  los cuales podrían asociarse con la presencia de *Pseudomonas* spp. en estas muestras. Mediante este estudio se pudo observar que los tratamientos UHPH aplicados a la leche no afectaron los niveles de péptidos hidrofílicos en comparación a la leche PA. Los péptidos hidrofóbicos están muy relacionados con la hidrólisis de las caseínas  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$  (Lemieux y Simard, 1991) y coincidiendo con los resultados previos de degradación de la fracción insoluble a pH 4,6, se observó un notable incremento durante el almacenamiento en las muestras tratadas a 200 MPa, sobre todo con  $T_i = 40^\circ\text{C}$ . Aquí es importante destacar que a pesar de que las muestras tratadas a 300 MPa generaron mayor hidrólisis de caseínas, no hubo diferencias con la leche PA en cuanto al contenido de péptidos hidrofóbicos, péptidos asociados con el defecto de amargor (Datta y Deeth, 2003).

Los valores de aminoácidos libres totales no mostraron una clara tendencia durante el almacenamiento de las leches, mientras que los valores de nitrógeno soluble a pH 4,6 en las muestras tratadas manifestaron una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) en comparación con la leche cruda debido a que los tratamientos tecnológicos produjeron la desnaturalización de las proteínas del suero, proteínas que forman parte de la fracción soluble a pH 4,6. Durante el almacenamiento, concordando con los resultados previos, el mayor incremento en el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 se dio en la muestra tratada a 200 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.6 Lipólisis

La lipólisis se evaluó mediante la cuantificación de ácidos grasos libres por cromatografía de gases tal como se detalla en el artículo 5 de la sección III (Pereda, Ferragut, Quevedo, Guamis y Trujillo, 2008c).

A pesar de que el perfil de ácidos grasos libres fue similar en todos los tipos de leches estudiadas, siendo el mirístico, palmítico, esteárico y oleico los ácidos grasos principales, tras los tratamientos la leche tratada a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  mostró una concentración de ácidos grasos libres totales de aproximadamente el doble comparada con el resto de las leches lo cual concuerda con el descenso del pH que se registró en dicha muestra (pH  $\sim 6,72$ ) en comparación al resto de los tratamientos (pH  $\sim 6,74$ ).

Durante el almacenamiento en refrigeración la concentración de ácidos grasos libres aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) únicamente en las muestras tratadas a 200 MPa. Es sabido que la LPL de la leche es una enzima relativamente termolábil siendo inactivada casi por completo durante un tratamiento de pasteurización baja a  $72^\circ\text{C}$  y 15 s (Deeth, 2006). Sin embargo, el efecto de la UHPH sobre dicha enzima no ha sido muy estudiado. Datta *et al.* (2005) trabajando con leche tratada a 200 MPa con diferentes temperaturas de entrada detectaron inactivación total cuando se alcanzaron temperaturas máximas superiores a los  $71^\circ\text{C}$  ( $T_i > 35^\circ\text{C}$ ), sin embargo Hayes *et al.* (2005) observaron una disminución del pH en muestras tratadas de 50 a 200 MPa con  $T_i = 45^\circ\text{C}$  tras ser refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$  por 24 h, y sugirieron que dicha disminución del pH podría deberse a una inactivación parcial de la LPL en las condiciones usadas. La intensa lipólisis producida a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  podría estar relacionada con la inactivación parcial de la LPL, debido a que la temperatura máxima alcanzada en este tratamiento fue de  $75^\circ\text{C}$  y el tiempo de retención sólo de  $\sim 0,5$  s, mientras que en el estudio de Datta *et al.* (2005) el tiempo de retención a la máxima temperatura alcanzada fue de 20 s.

Los signos de lipólisis en la leche tratada a 200 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  comenzaron a ser notables a partir del día 7 de almacenamiento, por lo que, esta demora en la lipólisis sumada a la temperatura máxima alcanzada ( $85^\circ\text{C}$ ), sugieren que la lipólisis en este caso se produjo posiblemente debido a la presencia de lipasas microbianas producidas por las *Pseudomonas* spp. y no a la LPL nativa de la leche. A pesar de que las *Pseudomonas* spp. también se detectaron a 300 MPa, aquí no se observó lipólisis probablemente debido a que los agregados formados generan una reducción del área interfacial sobre la cual pueden actuar las enzimas.

#### 4.2.7 Oxidación

La oxidación primaria se evaluó mediante la determinación de hidroperóxidos mientras que la secundaria se evaluó mediante la valoración del hexanal y de las sustancias reactivas al TBA (TBARS) según se ha descrito en el artículo 5 de la sección III (Pereda *et al.*, 2008c).

A pesar de que las leches homogenizadas son menos susceptibles a la oxidación que la leche cruda, los resultados aquí obtenidos indican que el tratamiento UHPH a 300 MPa produjo muestras poco estables frente a la oxidación lipídica. El menor valor de hidroperóxidos combinado con los mayores valores de hexanal y TBARS en las muestras tratadas a 300 MPa en comparación a las otras leches indica la progresión de la reacción de oxidación del estado primario al secundario. La mayor oxidación sufrida a 300 MPa podría estar relacionada con la formación de agregados. Cuando los glóbulos no están totalmente cubiertos por componentes proteicos, la grasa no queda completamente protegida y por lo tanto es más propensa a sufrir oxidación. Esta oxidación puede deberse a que a elevadas temperaturas se favorece la formación de radicales reactivos que pueden propagar la reacción, y/o a que las caseínas tienen la propiedad de poder unir metales prooxidantes en los residuos fosfoseriles (O'Brien y O'Connor, 2004).

Aunque la oxidación a 300 MPa fue superior al resto de las muestras, el contenido de hexanal en ninguna muestra superó el valor umbral de 49 ppb indicando que la oxidación sufrida no necesariamente debería indicar un problema asociado con el flavor (Day, Lillard y Montgomery, 1963).

#### 4.2.8 Indicadores del daño térmico

Debido al incremento de temperatura que sufre el producto durante el tratamiento UHPH llegándose a alcanzar temperaturas cercanas a los 100°C en el caso del tratamiento de 300 MPa con  $T_i = 40^\circ\text{C}$ , consideramos importante evaluar el daño térmico de dichas muestras y compararlo no sólo con su correspondiente control (PA) sino también con muestras comerciales sometidas a diferentes tratamientos térmicos (Artículo 6, sección VII, Pereda *et al.*, en revisión). Para ello la evaluación del daño térmico se estudió mediante dos tipos de reacciones (Mortier, Braekman, Cartuyvels, Van Renterghem y De Block, 2000): (1) la degradación, desnaturalización e inactivación de componentes sensibles al tratamiento térmico como las proteínas del



suero y las enzimas (indicadores de tipo I) y (2) la formación de nuevas sustancias como la lactulosa o productos de la reacción de Maillard (indicadores de tipo II).

#### *Indicadores de tipo I*

En cuanto a los indicadores de tipo I el efecto de la UHPH sobre las enzimas ya ha sido revisado en la sección 4.2.3.

Los niveles residuales de las proteínas del suero fueron analizados mediante HPLC, no detectándose diferencias entre muestras en cuanto al grado de desnaturalización de la  $\alpha$ -La que fue de un 10-20%, pero sí en referencia a la  $\beta$ -Lg la cual presentó un 35% de desnaturalización en las muestras UHPH y un 47% en la PA. Estos resultados mostraron que la estabilidad térmica de la  $\alpha$ -La fue superior a la  $\beta$ -Lg y además que ésta última fue más susceptible a las condiciones utilizadas en un tratamiento térmico que a la alta presión homogenización. Sin embargo, los valores de desnaturalización de la  $\beta$ -Lg obtenidos en las muestras UHPH son demasiado elevados para atribuirlos únicamente al efecto térmico. En el tratamiento de 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  en el que se alcanza una temperatura máxima de  $78,5^\circ\text{C}$  con una retención de menos de 1 s, obtuvimos un 32% de desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, mientras que  $\sim 8\%$  de  $\beta$ -Lg se desnaturaliza en leche tratada a  $72^\circ\text{C}$  y 15 s (Villamiel, Lopez Fandiño, Corzo y Olano, 1997). Es importante señalar que durante un tratamiento UHPH se dan de manera simultánea procesos térmicos y de homogenización. De hecho, Hayes *et al.* (2005) al tratar leche a 250 MPa alcanzó una temperatura máxima de  $83,6^\circ\text{C}$  y sugirió que las fuerzas experimentadas por la leche durante el tratamiento UHPH contribuyeron a la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg.

En todas las muestras excepto en la leche tratada a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$ , la variante genética B de la  $\beta$ -Lg fue más sensible a la desnaturalización que la variante A. Estos datos concuerdan con los de Nielsen, Singh y Latham (1996) quienes mostraron que cuando la concentración proteica es menor al 10% (el caso de nuestras leches) la variante B es más sensible a la desnaturalización por el calor que la variante A. Probablemente el hecho de que a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  no se hayan producido diferencias entre la desnaturalización de ambas variantes genéticas puede explicarse debido a que en dicho tratamiento la temperatura máxima alcanzada ( $75^\circ\text{C}$ ) fue inferior a las temperaturas de desnaturalización de ambas variantes (Huang, Catignani y Swaisgood, 1994), y tal como fue mencionado por Hayes *et al.* (2005) la

desnaturalización producida en este tratamiento podría haber sido ocasionada por las fuerzas mecánicas relacionadas con el tratamiento UHPH.

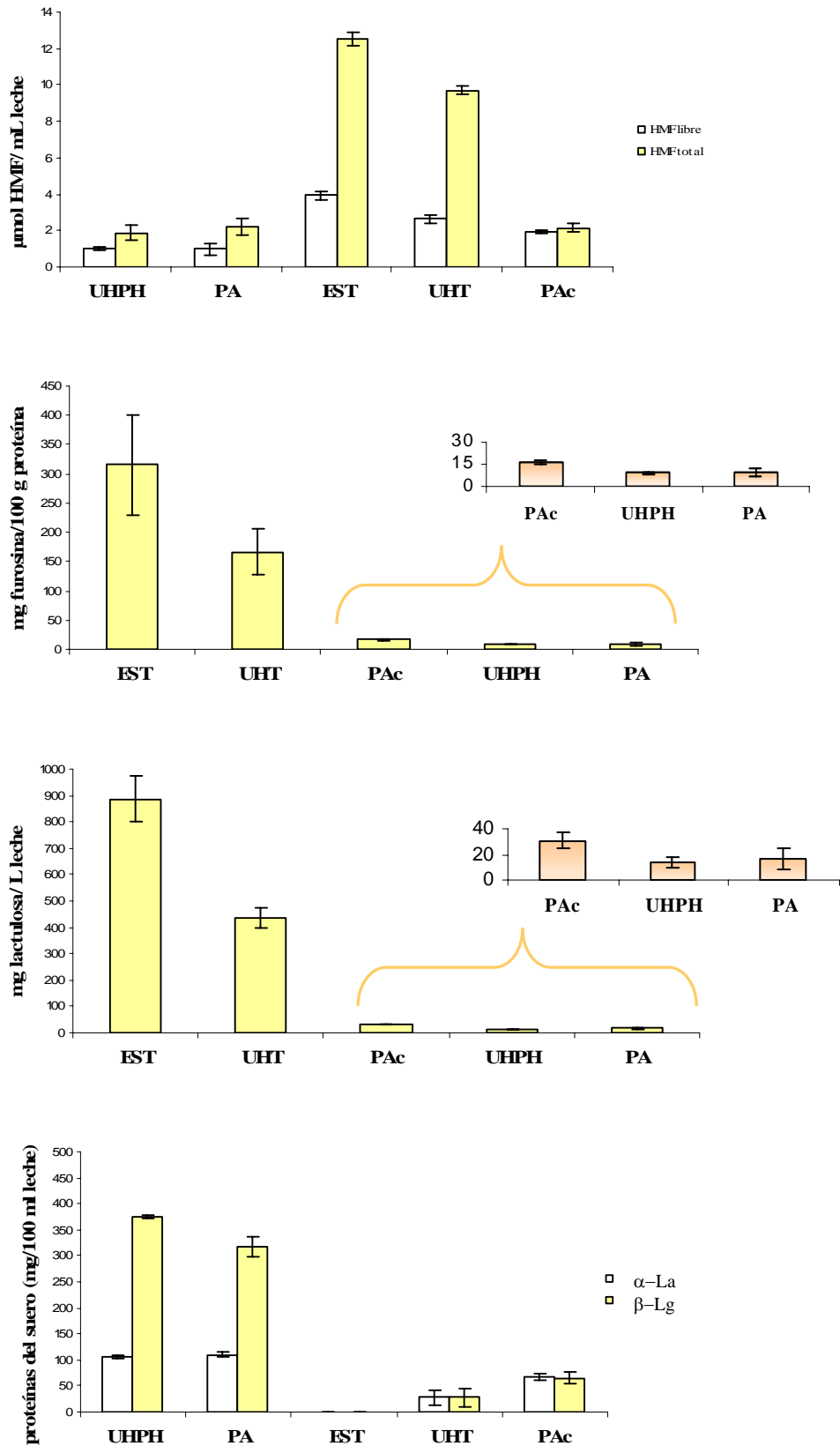
### *Indicadores de tipo II*

Estos indicadores se basan en la formación de nuevas sustancias, entre ellas, compuestos que absorben a 340 nm, grupos sulfidrilos (SH), compuestos formados en la reacción de Maillard como hidroximetilfurfural (HMF) y furosina, y finalmente la lactulosa.

No se detectaron diferencias entre las muestras UHPH y PA en cuanto a la formación de furosina y las muestras UHPH se caracterizaron por un menor contenido de compuestos que absorben a 340 nm como melanoidinas. Las muestras tratadas a 300 MPa y PA mostraron mayores valores de HMF que las muestras tratadas a 200 MPa. La lactulosa sólo se detectó en las leches PA y la UHPH tratada a 300 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  cuyo valor fue de aproximadamente 15 mg/kg, valor que se sitúa muy por debajo del límite máximo de 50 mg/kg para leches de pasteurización alta recomendado por el grupo de expertos en productos lácteos de la Unión Europea (Mortier *et al.*, 2000).

Normalmente el número de grupos sulfidrilos de una leche suele disminuir tras la aplicación de un tratamiento térmico (Owusu-Apensen, 2005), lo que pudimos observar en todas las leches. Sin embargo, sorprendentemente a 300 MPa la reducción de los grupos SH fue menor que la obtenida en las leches tratadas a 200 MPa. La explicación de este resultado, como ha sucedido con muchos otros a lo largo de esta discusión, podría estar relacionada con los agregados detectados en estas muestras. En primer lugar, al formarse estos agregados se produciría menor área superficial sobre la que podría interaccionar la  $\beta$ -Lg a través de enlaces disulfuro; por otro lado, si los agregados se forman a través de material proteico compartido, la proteína quedará atrapada entre glóbulos en vez de estar localizada en la superficie dificultando el acceso y la unión de la  $\beta$ -Lg desnaturalizada, preservando de esta manera una mayor cantidad de grupos SH.

A pesar de que las leches comerciales (UHT, esterilizada y pasteurizada) no provinieron de la misma fuente que las producidas en nuestra planta piloto, fueron de gran utilidad para obtener una comparación relativa entre estas muestras y las leches UHPH (Figura 8).



**Figura 8:** Concentración de hidroximetilfurfural (HMF) libre y total, furosina, lactulosa y niveles residuales de proteínas del suero en leches UHPH y de alta pasteurización (PA), y en leches comerciales esterilizada (EST), UHT y de alta pasteurización (PAc).

A través de esta comparación pudo comprobarse que, a pesar del incremento de temperatura generado durante el paso por la válvula, las muestras UHPH sufrieron menor reacción de Maillard, menor desnaturalización de las proteínas del suero y no presentaron isomerización de lactosa en comparación a las leches comerciales y a la PA.

El estudio de todos estos indicadores también permitió comprobar que las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en la industria para obtener leche de alta pasteurización fueron más severas que las utilizadas en el presente trabajo (90°C y 15 s) ya que la diferencia en la formación de lactulosa, furosina y desnaturalización de las proteínas del suero fue muy elevada.

Especialmente en productos lácteos, la reacción de Maillard genera una disminución del valor nutritivo debido a la disminución de aminoácidos esenciales como la lisina (Morales y Jiménez-Pérez, 1998a). Durante un tratamiento de pasteurización no suele haber grandes cambios del valor nutritivo. Sin embargo, durante tratamientos térmicos más severos como los tratamientos de esterilización además de pérdidas de lisina pueden darse considerables pérdidas de vitaminas como el ácido fólico, ácido ascórbico, vitamina B12 y tiamina (Anderson y Öste, 1995).

A pesar de que en esta tesis no se estudió la calidad nutricional de las leches sería de esperar que las leches UHPH, debido al reducido efecto térmico asociado a esta tecnología, el cual se ha comprobado a través del estudio de los indicadores térmicos, tuvieran una mejor calidad nutricional que las leches comerciales. Sin embargo, esta hipótesis debe verificarse ya que desconocemos el efecto que pueden ejercer las fuerzas generadas en la válvula de alta presión sobre compuestos como las vitaminas.

#### **4.2.9 Perfil de compuestos volátiles**

Los componentes volátiles de las leches se extrajeron mediante una técnica de microextracción en fase sólida (SPME) que permitió de manera fácil y sencilla la caracterización de estos compuestos a través de la cromatografía de gases complementada con la espectrofotometría de masas (GC-MS) (Artículo 3, sección III, Pereda, Jaramillo, Quevedo, Ferragut, Guamis y Trujillo, 2008a).

Cualitativamente el perfil de compuestos volátiles fue muy similar entre las muestras UHPH y la leche PA. Entre los compuestos identificados se incluyeron cetonas, aldehídos, compuestos azufrados, ácidos grasos, terpenos e hidrocarburos.

En general, y tras los tratamientos, las leches tratadas por UHPH a 200 MPa presentaron el menor contenido de cetonas, mientras que el mayor contenido de

aldehídos así como de cetonas (ambos productos de oxidación) se dio en las leches tratadas a 300 MPa. Contarini y Polovo (2002) en un trabajo en el que estudiaron el perfil de compuestos volátiles en leches comerciales sometidas a diferentes tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización UHT y en botella) describieron un incremento en la formación de cetonas con el incremento de la temperatura.

Durante el almacenamiento a 4°C no se observaron grandes cambios en el perfil de los compuestos volátiles, siendo el hecho más característico el incremento en la formación de ácidos en las muestras tratadas a 200 MPa. Tanto la formación de ácidos en la muestra tratada a 200 MPa como el mayor contenido de aldehídos, entre ellos hexanal, en el tratamiento a 300 MPa concuerdan con los resultados previos expuestos sobre lipólisis y oxidación.

Al igual que en el estudio de los indicadores del daño térmico, aquí también se procedió a comparar el perfil de compuestos volátiles con el de muestras comerciales. A partir de esta comparación se llegó a la conclusión de que los tratamientos térmicos intensos (UHT, esterilización en botella) resultaron en la formación de aldehídos y cetonas, mientras que el tratamiento UHPH (en las condiciones de presión y temperatura aquí estudiadas) sólo permitió la formación de aldehídos.

#### **4.2.10 Análisis sensorial**

Para llevar a cabo este análisis se entrenó un panel de 12 catadores a quienes se trató de familiarizar en primer lugar con posibles defectos que pueden encontrarse en las leches. Para ello durante varias semanas se les dio de probar muestras de leches con diversos defectos (rancio, ácido, cocido, amargo y oxidado) y diversas intensidades de estos defectos hasta que se consideró que los catadores seleccionados habían aprendido a identificarlos directamente sobre la leche. La Tabla 7 describe como se efectuó la preparación de las leches defectuosas.

Los catadores debieron describir las características sensoriales de las leches (color, viscosidad y flavor), aunque se hizo más hincapié en la descripción de los posibles defectos presentados por las leches.

**Tabla 7:** Preparación de las soluciones utilizadas para producir leches con diferentes defectos.

Defecto	Preparación
Rancidez	Adición de 6 gotas de solución alcohólica de ácido butírico al 1% en 250 mL de leche
Acidez	Adición de ácido láctico a la leche hasta pH 5,7
Cocido	1) Calentar 250 mL de leche a 75°C, 1 min. Sabor cocido leve. 2) Calentar 250 mL de leche hasta cerca de ebullición (85°C) al fuego y luego enfriar rápidamente. Sabor cocido fuerte.
Amargo	Adición a la leche de cafeína en una concentración de 0,06%.
Oxidación por luz	Adición de 4 gotas de solución etanólica de metional 0,01% a 500 mL de leche. Dejar toda la noche en refrigeración.

La leche de alta pasteurización fue calificada por la mayoría de los jueces (67%) con un sabor cocido. En cuanto a las leches tratadas por UHPH, la leche tratada a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  fue caracterizada con un sabor rancio por un 67% de los catadores mientras que el resto de los jueces la describió con un sabor extraño, raro, desagradable, sin saber decir exactamente qué era. La rancidez indicada coincide con los resultados de lipólisis en los que se vio que dicha muestra presentaba aproximadamente el doble de ácidos grasos libres en comparación con las otras. En cuanto a la leche de 200 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  hubo una gran disparidad de opiniones. Un 42% de los catadores la evaluó como una leche de sabor extraño, seguido de un 25% que asoció el sabor con cítricos a pesar de que no habían sido entrenados en este defecto. Este flavor a cítrico podría estar relacionado con el mayor contenido en limoneno que se detectó en esta muestra, así como en la de 300 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  en comparación con el resto. Hansen y Heinis (1992) describieron el flavor generado por el limoneno como un flavor cítrico o afrutado y observaron que la intensidad del flavor del limoneno disminuyó en la presencia de concentrados de proteínas del suero y caseínas debido a que dicho terpeno puede interaccionar y unirse a dichas proteínas, sobre todo a la  $\beta$ -Lg. A pesar de que no hubo diferencias significativas en el grado de desnaturalización de la  $\beta$ -Lg entre las muestras UHPH es posible que en estos tratamientos se hayan producido modificaciones conformacionales que limitasen la unión del limoneno a las proteínas.

La mayoría de los panelistas, un 67% y un 58% en el caso de las leches tratadas a 300 MPa  $T_i = 30^\circ\text{C}$  y 300 MPa  $T_i = 40^\circ\text{C}$ , respectivamente consideró que las leches tratadas a 300 MPa no presentaron ningún defecto y fueron preferidas en comparación con la leche PA. Sólo un 25% de los panelistas calificó a las leches tratadas a 300 MPa con un sabor oxidado. Esto demuestra que aunque las muestras tratadas a 300 MPa

sufrieron mayor oxidación que la leche PA, ésta apenas fue percibida por los consumidores. En el caso de la muestra tratada a 300 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  un 17% de los catadores la describió con el flavor cítrico al igual que en el caso de la leche de 200 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$ .

A pesar de las diferencias instrumentales detectadas entre muestras en el color y en la viscosidad, dichos cambios no fueron detectados sensorialmente por los catadores.

# SECCIÓN V

---

Conclusiones





---

## 5. Conclusiones

1. Los tratamientos de alta presión por homogenización (UHPH) en el intervalo de presión de 200 - 300 MPa en etapa simple o etapa doble (30 MPa) con temperaturas de entrada del producto de 30 y 40°C, al igual que el tratamiento de pasteurización alta, aplicados en leche con una carga microbiana inicial media de 4,9 ufc/mL reducen aproximadamente 3,5 ciclos logarítmicos los recuentos de bacterias mesófilas totales, psicrótrofos y lactococos, no detectándose la presencia de coliformes, lactobacilos, enterococos y *Pseudomonas* spp. Sin embargo, la reducción alcanzada por el tratamiento de UHPH a 100 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  no es suficiente para cumplir con las condiciones microbiológicas establecidas por normativa para una leche tratada térmicamente destinada al consumo humano.
2. Teniendo en consideración sólo la evolución de los recuentos microbianos durante el almacenamiento en refrigeración de las leches tratadas, tanto el tratamiento de alta pasteurización como los tratamientos UHPH a presiones  $\geq 200$  MPa permiten obtener leche con una vida útil de 14 - 18 días.
3. Los tratamientos UHPH generan cambios en las propiedades físicas de las leches. El análisis de tamaño de partícula muestra una considerable reducción del tamaño de partícula producido por la UHPH en comparación con un tratamiento de homogenización convencional y una distribución de tamaño polidispersa a 300 MPa asociada con la formación de agregados, la cual conduce a mayores valores de viscosidad en las leches tratadas a 300 MPa que a 200 MPa, diferencia que no es percibida sensorialmente por el panel de catadores. A pesar de la formación de dichos agregados las leches UHPH no mostraron signos de desnatado espontáneo durante el almacenamiento en refrigeración.
4. Los tratamientos UHPH a presiones superiores a 200 MPa, así como el tratamiento de alta pasteurización, inactivan completamente la fosfatasa alcalina de la leche. Sin embargo, la lactoperoxidasa no es completamente inactivada en

los tratamientos a 200 MPa, y la plasmina no es inactivada totalmente por ninguno de los tratamientos aplicados, aunque su zimógeno plasminógeno mostró una gran sensibilidad hacia los tratamientos aplicados. Los datos demuestran que al incrementar la presión aumenta la inactivación enzimática, sin embargo, no necesariamente, a igual presión y mayor temperatura se alcanzan mayores niveles de inactivación, lo que demuestra que la inactivación enzimática producida por la UHPH no sólo es debida al efecto térmico sino que las fuerzas generadas en el fluido al pasar por la válvula de alta presión juegan un papel importante.

5. Las leches tratadas por UHPH a 300 MPa, a pesar de tener contenidos similares en plasmina que una leche de pasteurización alta, sufren una mayor hidrólisis de las caseínas durante el almacenamiento, posiblemente debido a la reducción del tamaño de la micela de caseína que conlleva un incremento del área superficial facilitando el acceso y acción de la plasmina.
6. El estudio de lipólisis muestra que cualitativamente el perfil de ácidos grasos libres es semejante en las leches UHPH y PA. Sin embargo, cuantitativamente la leche tratada a 200 MPa y  $T_i = 30^\circ\text{C}$  se diferencia significativamente de las otras debido a su elevado contenido en ácidos grasos libres tras el tratamiento, resultado que puede explicarse en base a una inactivación parcial de la LPL de la leche en dicho tratamiento y que coincide con el marcado descenso del pH que se detectó en esta muestra y con la descripción de rancidez realizada por los panelistas en el análisis sensorial. Las leches tratadas a 200 MPa y  $T_i = 40^\circ\text{C}$  hacia el final del almacenamiento en refrigeración presentan un ligero aumento de FFA, hecho que se puede relacionar con la producción de lipasas por microorganismos psicrótrofos como las *Pseudomonas* spp.
7. Los valores analíticos obtenidos para los productos de oxidación secundaria, TBARS y hexanal, y para el producto de oxidación primaria, hidroperóxidos, permiten una clara discriminación entre muestras. El menor contenido en hidroperóxidos junto a los mayores niveles de TBARS y hexanal en las leches tratadas a 300 MPa indican la progresión de la oxidación hacia la etapa secundaria, lo que sugiere, que las leches tratadas a 300 MPa son menos estables

frente a la oxidación lipídica que las leches PA y las tratadas a 200 MPa. Aunque las muestras tratadas a 300 MPa sufren mayor oxidación que la leche PA tal como indican las determinaciones analíticas, este defecto no fue percibido por la mayoría de los consumidores que la describieron como una leche sin defectos, siendo la leche más apreciada en su valoración global.

8. La aplicación de la UHPH no modifica cuantitativamente el perfil de compuestos volátiles, excepto en las leches tratadas a 200 MPa en las que, coincidiendo con los resultados de lipólisis, su perfil se caracteriza por la presencia de ácidos grasos. Cuantitativamente, el tratamiento de 300 MPa produce mayor contenido de aldehídos y cetonas que el tratamiento PA, pero menos que una leche PA comercial indicando que las condiciones térmicas utilizadas en la industria son más elevadas.
9. El estudio de indicadores del tratamiento térmico muestra que no existen diferencias importantes en cuanto a la formación de los compuestos estudiados (reacción de Maillard, isomerización de lactosa) entre las leches UHPH y PA, siendo la mayor diferencia el grado de desnaturalización superior de las proteínas del suero en las leches PA. Tanto el tratamiento UHPH como el tratamiento de pasteurización producen una desnaturalización mayor de la  $\beta$ -Lg que de la  $\alpha$ -La, siendo la  $\beta$ -Lg más susceptible a la desnaturalización en un tratamiento térmico que en condiciones de alta presión homogenización.
10. El tratamiento UHPH de 300 MPa con  $T_i = 30^\circ\text{C}$  podría utilizarse como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche de consumo. Este tratamiento permite alcanzar niveles microbiológicos comparables a una leche de pasteurización alta, mostrando características físico-químicas y organolépticas similares a una leche PA pero evitando el sabor a cocido característico de ésta última y la tendencia al desnatado durante su almacenamiento. Por otra parte, esta leche se caracteriza por ser fosfatasa y lactoperoxidasa negativa y por la ausencia de formación de lactulosa.



# **SECCIÓN VI**

---

## **Bibliografía**



---

## 6. Bibliografía

**Acquistucci, R., Panfili, G., y Marconi, E.** (1996). Application of the microwave hydrolysis to furosine determination in cereal and dairy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 3855-3857.

**Anderson, I. y Öste, R.** (1995). Nutritional quality of heat processed liquid milk. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 279-307). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.

**Andreini, R., Chiodi, J., De Noni, I., Resmini, P., Battelli, G., Cecchi, L., Todesco, R., Cattaneo, T. M. P., Rampilli, M., y Foschino, R.** (1990). Valutazione del danno termico nel latte UHT e sterile in bottiglia commercializzato in Italia. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, *41*, 472-492.

**Baldi, A., Savoini, G., Cheli, F., Fantuz, F., Senatore, E., Bertocchi, L., y Politis, I.** (1996). Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in milk from italian herds. *International Dairy Journal*, *6*, 1045-1053.

**Barrett, N. E., Grandison, A. S., y Lewis, M. J.** (1999). Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, *66*, 73-80.

**Bastian, E. D., y Brown, R. J.** (1996). Plasmin in milk and dairy products: an Update. *International Dairy Journal*, *6*, 435-457.

**Bendall, J. G.** (2001). Aroma compounds of fresh milk from New Zealand cows fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4825-4832.

**Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M. R., y Sinigaglia, M.** (2007). Effects of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*, *45*, 382-386.

**Bjorck, L., Rosén, C. G., Marshall, V., y Reiter, B.** (1975). Antibacterial Activity of the Lactoperoxidase System in Milk Against Pseudomonads and Other Gram-Negative Bacteria. *Applied Microbiology*, August, 199-204.

**Boelrijk, A. E. M., de Jong, C., y Smit, G.** (2003). Flavour generation in dairy products. In G. Smit, *Dairy Processing* (pp. 130-154). Woodhead Publishing Limited: New York, EEUU.

**Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., y Legrand, J.** (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high pressure treatment. *International Dairy Journal*, *16*, 275-284.

**Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández Herrero, M. M., y Guamis, B.** (2007). Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20°C. *Food Control*, *18*, 1282-1288.

**Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., y Guamis, B.** (2006a). Inactivation by Ultrahigh-Pressure Homogenization of *Escherichia coli* Strains Inoculated into Orange Juice. *Journal of Food Protection*, *69*, 984-989.

**Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., y Guamis, B.** (2006b). Inactivation of *Listeria innocua* in Milk and Orange Juice by Ultrahigh-Pressure Homogenization. *Journal of Food Protection*, *69*, 86-92.



- Bríñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., y Guamis, B.** (2006c). Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation. *Le Lait*, 86, 241-249.
- Burgaud, I., Dickinson, E., y Nelson, P. V.** (1990). An improved high-pressure homogenizer for making fine emulsion on a small scale. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 39-46.
- Bury, D., Jelen, P., y Kaláb, M.** (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 23-29.
- Calvo, M. M., y de la Hoz, L.** (1992). Flavour of Heated milks. A review. *International Dairy Journal*, 2, 69-81.
- Chavarri, F., Virto, M., Martín, C., Nájera, A. I., Santisteban, A., Barrón, L. J. R., y de Renobales, M.** (1997). Determination of free fatty acids in cheese: Comparison of two analytical methods. *Journal of Dairy Research*, 64, 445-452.
- Christensen, K. R., y Reineccius, G. A.** (1992). Gas Chromatographic analysis of volatile sulfur compounds from heated milk using static headspace sampling. *Journal of Dairy Science*, 75, 2098-2104.
- Cladman, W., Scheffer, S., Goodrich, N., y Griffiths, M. W.** (1998). Shelf life of milk packaged in plastic containers with and without treatment to reduce light transmission. *International Dairy Journal*, 8, 629-636.
- Clare, D. A., Bang, W. S., Cartwright, G., Drake, M. A., Coronel, P., y Simunovic, J.** (2005). Comparison of sensory, microbiological, and biochemical parameters of microwave versus indirect UHT fluid skim milk during storage. *Journal of Dairy Science*, 88, 4172-4182.
- COAG.** (2006). Anuario 2006 COAG. Situación actual sector lácteo. Coordinadora de organizaciones de agricultores y ganaderos. [www.coag.org](http://www.coag.org)
- Comisión del Codex Alimentarius.** (1996) Informe de la segunda reunión del comité del Codex sobre la leche y los productos lácteos. 27 - 31 de Mayo, Roma, Italia.
- Contarini, G., y Povo, M.** (2002). Volatile fraction of milk: comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7350-7355.
- Contarini, G., Povo, M., Leardi, R., y Toppino, P. M.** (1997). Influence of Heat treatment on the volatile compounds of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3171-3177.
- Creamer, L. K.** (2004). Casein nomenclature, structure and association properties. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1895-1902). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.
- Croguennec, T., O'Kennedy, B. T., y Mehra, R.** (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14, 399-409.
- Datta, N. y Deeth, H. C.** (2004a). Alternatives to Heat treatment: High-Pressure processing. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1327-1333). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

- Datta, N. y Deeth, H. C.** (2004b). Other nonthermal technologies. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1339-1346). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.
- Datta, N., y Deeth, H. C.** (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 36, 173-182.
- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., y Kelly, A. L.** (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 1-7.
- Day, E. A., Lillard, D. A., y Montgomery, M. W.** (1963). Autoxidation of milk lipids III. Effect on flavor of the additive interactions of carbonyl compounds at subthreshold concentrations. *Journal of Dairy Science*, 46, 291-294.
- De Block, J., Merchiers, M., Van Renterghem, R., y Moermans, R.** (1996). Evaluation of two methods for the determination of lactulose in milk. *International Dairy Journal*, 6, 217-222.
- de Jong, C., y Badings, H. T.** (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 94-98.
- de la Fuente, M. A.** (1998). Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 281-288.
- De Noni, I., Pellegrino, L., Cattaneo, S., y Resmini, P.** (2007). HPLC of proteose peptones for evaluating ageing of packaged pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 17, 12-19.
- De Wit, R. y Nieuwenhuijse, H.** (2008). Kinetic modelling of the formation of sulphur-containing flavour components during heat-treatment of milk. *International Dairy Journal*, 18, 539-547.
- Deeth, H. C.** (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16, 555-562.
- Deeth, H. C. y Datta, N.** (2004). Alternatives to Heat treatment: Pulsed energy technologies. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1333-1339). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.
- Deeth, H. C. y Fitz-Gerald, C. H.** (2006). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids* (pp. 481-554). Springer: New York, EEUU.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., y Michiels, C. W.** (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 281-291.
- Diels, A. M. J., De Taeye, J., y Michiels, C. W.** (2005). Sensitisation of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 165-175.
- Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., y Michiels, C. W.** (2003). Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 55-62.

**Directiva Europea 92/46/EEC** (1992). Council Directive of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. *Official Journal L* 268, 1-32.

**Duncan, S. E., y Christen, G. L.** (1991). Sensory detection and recovery by acid degree value of fatty acids added to milk. *Journal of Dairy Science*, 74, 2855-2859.

**Dunkley, W. L., Franklin, J. D., y Pangborn, R. M.** (1962). Influence of homogenization, copper and ascorbic acid on light-activated flavor in milk. *Journal of Dairy Science*, 45, 1040-1044.

**Elliot, A. J., Datta, N., Amenu, B., y Deeth, H. C.** (2005). Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *Journal of Dairy Research*, 72, 442-446.

**Elwell, M. W., y Barbano, D. M.** (2006). Use of microfiltration to improve fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 89, E10-E30.

**Enright, E., Bland, A. P., Needs, E. C., y Kelly, A. L.** (1999). Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO<sub>3</sub> addition. *International Dairy Journal*, 9, 581-591.

**Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K. D., y Nielsen, S. S.** (2000). Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2190-2199.

**FAO.** (2006) Food and Agriculture Organization (FAO).www.fao.org

**Farkye, N. Y., y Fox, P. F.** (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59, 209-216.

**Farkye, N. Y. y Imafidon, G. I.** (1995). Thermal denaturation of indigenous milk enzymes. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk*. (pp. 331-348). International Dairy Federation: Belgium, Brussels.

**Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., y Martin, J. H.** (1997). Effects of Microfluidizer Technology on *Bacillus licheniformis* Spores in Ice Cream Mix. *Journal of Dairy Science*, 80, 2184-2187.

**Fenaille, F., Mottier, P., Turesky, R. J., Ali, S., y Guy, P. A.** (2001). Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of Chromatography A*, 921, 237-245.

**Fenaille, F., Parisoda, V., Visani, P., Populaire, S., Tabet, J.-C., y Guy, P. A.** (2006). Modifications of milk constituents during processing: a preliminary benchmarking study. *International Dairy Journal*, 16, 728-739.

**Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., y Desrumaux, A.** (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59, 843-853.

**Floury, J., Desrumaux, A., y Lardières, J.** (2000). Effect of high pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil in water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 127-134.

**Floury, J., Legrand, J., y Desrumaux, A.** (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*, 59, 1285-1294.

- Folkertsma, B., y Fox, P. F.** (1992). Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 217-224.
- Fox, P. F.** (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P. F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1: Proteins* (pp. 1-48). Elsevier Publisher Ltd.: London, UK.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.** (1998a). Enzymology of milk and milk products. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 317-346). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.** (1998b). Heat - induced changes in milk. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 347-378). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.** (1998c). Milk Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 67-141). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.** (1998d). Physical properties of milk. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 437-461). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.** (1998e). Production and utilization of milk. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 1-20). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- Garcia-Risco, M. R., Ramos, M., y Lopez Fandiño, R.** (1999). Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1171-1178.
- Gonzalez-Cordova, A. F., y Vallejo-Cordova, B.** (2001). Quantitative determination of short chain free fatty acids in milk using solid phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4603-4608.
- Gordon, D. T., y Morgan, M. E.** (1973). Principal volatile compounds in feed flavored milk. *Journal of Dairy Science*, 55, 905-912.
- Goursaud, J.** (1991). Composición y propiedades físico-químicas. In F. M. Luquet, J. Keilling, & R. De Wilde, *Leche y Productos Lácteos* (pp. 3-89). Ed Acribia: Zaragoza, España.
- Grácia-Juliá, A., René, M., Cortés-Muñoz, M., Picart, L., López-Pedemonte, T., Chevalier, D., y Dumay, E.** (2008). Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: A comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 22, 1014-1032.
- Guerzoni, M. E., Vannini, L., Chaves Lopez, C., Lanciotti, R., Suzzi, G., y Gianotti, A.** (1999). Effect of High Pressure Homogenization on Microbial and Chemico-Physical Characteristics of Goat Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 82, 851-862.
- Guingamp, M. F., Humbert, G., y Linden, G.** (1993). Determination of sulfhydryl groups in milk using Ellman's procedure and clarifying reagent. *Journal of Dairy Science*, 76, 2152-2155.
- Guingamp, M. F., Humbert, G., Midon, P., Nicolas, M., y Linden, G.** (1999). Screening procedure for evaluating heat load in commercial milks. *Lait*, 79, 457-463.

- Hansen, A. P., y Heinis, J. J.** (1992). Benzaldehyde, citral, and d-Limonene Flavor perception in the presence of casein and whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 75, 1211-1215.
- Harwalkar, V. R.** (1992). Age gelation of sterilised milks. In P. F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1: Proteins* (pp. 691-734). Elsevier Applied Science Publishers: London, England.
- Havemose, M. S., Justesen, P., Bredie, W. L. P., y Nielsen, J. H.** (2007). Measurement of Volatile Oxidation products from milk using solvent-assisted flavour evaporation and solid phase microextraction. *International Dairy Journal*, 17, 746-752.
- Hayes, M. G., Fox, P. F., y Kelly, A. L.** (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 25-33.
- Hayes, M. G., y Kelly, A. L.** (2003a). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70, 307-313.
- Hayes, M. G., y Kelly, A. L.** (2003b). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297-305.
- Hernández, A., y Harte, F. M.** (2008). Manufacture of acid gels from skim milk using high-pressure homogenization. *Journal of Dairy Science*, 91, 3761- 3767.
- Hinrichs, J. y Kessler, H. G.** (1995). Thermal processing of milk. Processes and equipments. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 9-21). International Dairy Federation: Belgium, Brussels.
- Hinrichs, J. y Rademacher, B.** (2004). Sterilization of milk and other products. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 2569-2577). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.
- Holt, C.** (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43, 63-151.
- Holt, C.** (1998). Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. *Journal of Dairy Science*, 81, 2994-3003.
- Horne, D. S.** (1998). Casein interactions: Casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8, 171-177.
- Huang, X. L., Catignani, G. L., y Swaisgood, H. E.** (1994). Relative structural stabilities of  $\beta$ -lactoglobulins A and B as determined by proteolytic susceptibility and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1276-1280.
- Huppertz, T. y Kelly, A. L.** (2006). Physical chemistry of milk fat globules. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids* (pp. 173-212). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- IDF** (1981). Milk determination of fat content. Butyrometer Gerber. IDF Standard 105. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.
- IDF** (1987). Milk, cream and unsweetened evaporated milk. Determination of total solid content. IDF Standard 21B. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.

**IDF** (1995). Lait. Determination de la teneur en lactulose: Methode enzymatique. IDF Standard 175. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.

**IDF** (2002). Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. IDF Standard 185. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.

**IDF** (2004). Milk and milk products. Determination of furosine content. Ion/pair reverse/phase high/performance liquid chromatography method. IDF Standard 193. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.

**Imafidon, G. I., NG-Kwai-Hang, K. F., Harwalkar, V. R., y Ma, C. Y.** (1991). Differential scanning calorimetric study of different genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 74, 2416-2422.

**Imhof, R., y Bosset, J. O.** (1994). Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 27, 265-269.

**Iucci, L., Patrignani, F., Vallicelli, M., Guerzoni, M. E., y Lanciotti, R.** (2007). Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 558-565.

**Jang, H. D., y Swaisgood, H. E.** (1990). Disulfide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\kappa$ -casein in casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73, 900-904.

**Jelen, P. y Rattray, W.** (1995). Thermal denaturation of whey proteins. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 66-85). International Dairy Federation: Belgium, Brussels.

**Johnston, D. E., Austin, B. A., y Murphy, R. J.** (1992). Effects of hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 47, 760-763.

**Keeney, M., y Bassette, R.** (1959). Detection of intermediate compounds in the early stages of browning in milk products. *Journal of Dairy Science*, 42, 945-960.

**Kelemen, M. V., y Sharpe, J. E. E.** (1979). Controlled cell disruption: A comparison of the forces required to disrupt different microorganisms. *Journal of Cell Science*, 35, 431-441.

**Kennedy, A., y Kelly, A. L.** (1997). The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. *International Dairy Journal*, 7, 717-721.

**Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., y Fliss, I.** (2002). Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12, 435-446.

**Kim, Y. D., y Morr, C. V.** (1996). Dynamic headspace analysis of light activated flavor in milk. *International Dairy Journal*, 6, 185-193.

**Kleining, A. R., y Middelberg, A. P. J.** (1998). On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*, 53, 891-898.

**Kohlmann, K. L., Nielsen, S. S., y Ladisch, M. R.** (1991). Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *Journal of Dairy Science*, 74, 4125-4136.

**Kolakowski, P., Dumay, E., y Cheftel, J. C.** (2001). Effects of high pressure and low temperature on  $\beta$ -lactoglobulin unfolding and aggregation. *Food Hydrocolloids*, *15*, 215-232.

**Lanciotti, R., Chaves Lopez, C., Patrignani, F., Paparella, A., Guerzoni, M. E., Serio, A., y Suzzi, G.** (2004). Effects of milk treatment with HPH on microbial population as well as on the lipolytic and proteolytic profiles of Crescenza cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *57*, 19-25.

**Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Iucci, L., Vallicelli, M., Ndagijimana, M., y Guerzoni, M. E.** (2006). Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. *Journal of Dairy Research*, *73*, 216-226.

**Lanciotti, R., Vannini, L., Pittia, P., y Guerzoni, M. E.** (2004). Suitability of high dynamic pressure treated milk for the production of yoghurt. *Food Microbiology*, *21*, 753-760.

**Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M. E., Suzzi, G., Belletti, N., y Gardini, F.** (2007a). Effect of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*, *104*, 693-701.

**Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Saracino, P., y Guerzoni, M. E.** (2007b). Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chemistry*, *102*, 542-550.

**Larsen, L. B., Wium, H., Benfeldt, C., Heegaard, C. W., Ardö, Y., Qvist, K. B., y Petersen, T. E.** (2000). Bovine milk procathepsin D: Presence and activity in heated milk and in extracts of rennet-free UF-Feta cheese. *International Dairy Journal*, *10*, 67-73.

**Law, A. J. R., Horne, D. S., Banks, J. M., y Leaver, J.** (1994). Heat-induced changes in the whey proteins and caseins. *Milchwissenschaft*, *49*, 125-129.

**Lawrence, R. C.** (1991). Incorporation of whey proteins in cheese. In P. F. Fox, *Factors Affecting the Yield of Cheese* (pp. 79-87). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.

**Lee, S.-J., y Sherbon, J. W.** (2002). Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *Journal of Dairy Research*, *69*, 555-567.

**Lemieux, L., y Simard, R. E.** (1991). Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait*, *71*, 599-636.

**Luquet, F. M., Keilling, J., y De Wilde, R.** (1991). Composición y propiedades físico-químicas. *Leche y Productos Lácteos* (pp. 3-89). Ed Acribia: Zaragoza, España.

**Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D. M., Galton, D. M., Rudan, M. A., y Boor, K. J.** (2000). Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, *83*, 264-274.

**MAPA** (2006). Consumo de leche y derivados lácteos en España. Año móvil oct 2005 -sept 2006. *Ministerio De Agricultura, Pesca y Alimentación*.  
[www.mapa.es/alimentacion/pags/consumo/comercializacion/](http://www.mapa.es/alimentacion/pags/consumo/comercializacion/)

**MAPA** (2007). Anuario de estadística Agroalimentaria. *Ministerio De Agricultura, Pesca y Alimentación*, [www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm](http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm)

- Marconi, E., Messia, M. C., Amine, A., Moscone, D., Vernazza, F., Stocchi, F., y Palleschi, G.** (2004). Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. *Food Chemistry*, *84*, 447-450.
- Marín, E., Sánchez, L., Pérez, M. D., Puyol, P., y Calvo, M.** (2003). Effect of heat treatment on bovine lactoperoxidase activity in skim milk: Kinetic and Thermodynamic Analysis. *Food Chemistry and Toxicology*, *68*, 89-93.
- Marsili, R.** (2004). Flavours and off-flavours in dairy foods. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1069-1081). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.
- McClements, D. J., y Decker, E. A.** (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, *65*, 1270-1282.
- Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W., y Griffiths, M. W.** (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection*, *54*, 969-979.
- Metwalli, A. A. M., de Jongh, H. H. J., y van Boekel, M. A. J. S.** (1998). Heat inactivation of Bovine Plasmin. *International Dairy Journal*, *8*, 47-56.
- Meunier-Goddik, L. y Sandra, S.** (2004). Pasteurized milk. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1627-1632). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.
- Michalski, M. C., y Januel, C.** (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science and Technology*, *17*, 423-437.
- Middelberg, A. P. J.** (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, *13*, 491-551.
- Middelberg, A. P. J., y O'Neill, B. K.** (1993). A correlation for the effective strength of *Escherichia coli* during homogenization. *Biotechnology Progress*, *9*, 109-112.
- Morales, F. J., y Jiménez-Pérez, S.** (1998a). Monitoring of Heat Induced Proteolysis in Milk and Milk-Resembling Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4391-4397.
- Morales, F. J., y Jiménez-Pérez, S.** (1998b). Study of Hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the amadori product in milk-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 3885-3890.
- Morales, F. J., y Jiménez-Pérez, S.** (1999). HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *Journal of Food Science*, *64*, 855-859.
- Morales, F. J., Romero, C., y Jiménez-Pérez, S.** (1997). Application of the Clarifying Reagent index as a heat-induced parameter in commercial milk. *Journal of Food Protection*, *60*, 1241-1246.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J., y Fliss, I.** (2002). Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal*, *12*, 907-913.
- Mortier, L., Braekman, A., Cartuyvels, D., Van Renterghem, R., y De Block, J.** (2000). Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, *4*, 221-225.



**Mounchili, A., Wichtel, J. J., Bosset, J. O., Dohoo, I. R., Imhof, M., Altieri, D., Mallia, S., y Stryhn, H.** (2005). HS-SPME gas chromatographic characterization of volatile compounds in milk tainted with off flavour. *International Dairy Journal*, 15, 1203-1215.

**Nawar, W. W.** (2000). Lípidos. In Fennema.O.W, *Química De Los Alimentos* (pp. 269-381). Ed Acribia: Zaragoza, España.

**Nielsen, B. T., Singh, H., y Latham, J. M.** (1996). Aggregation of bovine  $\beta$ -lactoglobulins A and B on heating at 75°C. *International Dairy Journal*, 6, 519-527.

**Nielsen, S. S.** (2004). Plasmin system in milk. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 929-934). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

**Nieuwenhuijse, J. y van Boekel, M. A. J. S.** (2006). Protein stability in sterilised milk and milk products. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1: Proteins. Part B* (pp. 947-974). Kluber Academic/Plenum Publishers: New York, EEUU.

**Nursten, H. E.** (1995). Heat-induced changes in the flavour of milk. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 308-317). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.

**Odrizola-Serrano, I., Bendicho-Porta, S., y Martin-Belloso, O.** (2006). Comparative Study on Shelf life of whole milk processed by High-Intensity Pulsed Electric Field or Heat treatment. *Journal of Dairy Science*, 89, 905-911.

**Olson, D. W., White, C. H., y Richter, R. L.** (2004). Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 3217-3223.

**Ono, T., y Obata, T.** (1989). A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*, 56, 453-461.

**Ostdal, H., Andersen, H. J., y Nielsen, J. H.** (2000). Antioxidative Activity of Urate in Bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5588-5592.

**Owusu-Apensen, R.** (2005). Colorimetric analysis of protein sulfhydryl groups in milk: applications and processing effects. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 45, 1-23.

**O'Brien, J.** (1995). Heat-induced changes in lactose: isomerization, degradation, maillard browning. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 134-170). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.

**O'Brien, J.** (1997). Reaction chemistry of lactose: non-enzymatic degradation pathways and their significance in dairy products. In P. F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3: Lactose, Water, Salts and Vitamins* (pp. 155-231). Elsevier Publisher Ltd.: London, UK.

**O'Brien, N. M. y O'Connor, T. P.** (2004). Lipid oxidation. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1600-1604). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

**O'Connor, T. P. y O'Brien, N. M.** (2006). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids* (pp. 557-600). Springer: New York, EEUU.

**O'Sullivan, M. M., Kelly, A. L., y Fox, P. F.** (2002). Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 69, 332-341.

**Pandolfe, W. D.** (1999). Homogenizers. In F. J. Franci, *Encyclopedia of Food Science and Technology* (pp. 1289-1294). Wiley: New York, EEUU.

- Papachristou, C., Badeka, A., Chouliara, E., Kondyli, E., Athanasoulas, A., y Kontominas, M. G.** (2006). Evaluation of polyethylene terephthalate as a packaging material for premium quality whole pasteurized milk in Greece. *European Food Research and Technology*, 223, 711-718.
- Paquin, P.** (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9, 329-335.
- Patrick, P. S., y Swaisgood, H. E.** (1976). Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high-temperature heating and subsequent storage. *Journal of Dairy Science*, 59, 594-600.
- Patrignani, F., Iucci, L., Lanciotti, R., Vallicelli, M., Maina Mathara, J., Holzapfel, W. H., y Guerzoni, M. E.** (2007). Effect of High-Pressure Homogenization, Nonfat Milk Solids, and Milkfat on the Technological Performance of a Functional Strain for the Production of Probiotic Fermented Milks. *Journal of Dairy Science*, 90, 4513-4523.
- Pereda, J., Jaramillo, P. D., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., y Trujillo, A. J.** (2008a). Characterization of volatile compounds in ultra-high pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, 18, 826-834.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Trujillo, A.** (2008b). Effects of ultrahigh pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7125-7130.
- Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., y Trujillo, A.** (2008c). Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 111, 696-702.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Trujillo, A. J.** (2007). Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1081-1093.
- Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., y Trujillo, A.** (2006). Effect of ultra high-pressure homogenisation on natural-occurring micro-organisms in bovine milk. *Milchwissenschaft*, 61, 245-248.
- Perrier Cornet, J. M., Marie, P., y Gervais, P.** (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein stabilized oil in water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering*, 66, 211-217.
- Phadungath, C.** (2005). Casein micelle structure: a concise review. *Journal of Science and Technologie*, 27, 201-212.
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., y Dumay, E.** (2006). Effects of high pressure homogenization of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*, 73, 454-463.
- Popper, L., y Knorr, D.** (1990). Applications of High-Pressure Homogenization for Food Preservation. *Food Technology*, 44, 84-89.
- Pouliot, Y., Boulet, M., y Paquin, P.** (1989). Observations on the heat-induced salt balance changes in milk I. Effect of heating time between 4 and 90°C. *Journal of Dairy Research*, 56, 185-192.

**Prado, B. M., Sombers, S. E., Ismail, B., y Hayes, K. D.** (2006). Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk. *International Dairy Journal*, 16, 593-599.

**Qi, P. X.** (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait*, 87, 363-383.

**Quevedo, J. M., Buffa, M., Guamis, B., y Trujillo, A.** (2008). Effect of Ultra-High-Pressure Homogenization of Goats' milk on textural, microstructural and colour characteristics during cheese ripening. *5th IDF Symposium on Cheese Ripening*, Bern, Switzerland.

**Rankin, S. A.** (2004). Super-Pasteurized milk. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1633-1637). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

**Recio, I., y Olieman, C.** (1996). Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 17, 1228-1233.

**Recio, I., Pérez-Rodríguez, M. L., Ramos, M., y Amigo, L.** (1997). Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *Journal of Chromatography A*, 768, 47-56.

**Reglamento (CE) nº 2073/2005 (2005)** de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables de los productos alimenticios. *Diario Oficial De La Unión Europea L322*, 12-29.

**Rerkrai, S., Jeon, I. J., y Bassette, R.** (1987). Effect of various direct ultra-high temperature heat treatments on flavor of commercially prepared milks. *Journal of Dairy Science*, 70, 2046-2054.

**Resmini, P., Pellegrino, L., Andreini, R., y Prati, F.** (1989). Determinazione delle sieroproteine solubili del latte per HPLC. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 40, 7-23.

**Resmini, P., Pellegrino, L., y Battelli, G.** (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Italian Journal of Food Science*, 3, 173-183.

**Richardson, B. C.** (1983). The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 233-252.

**Richardson, B. C., y Pearce, K. N.** (1981). The determination of plasmin in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16, 209-220.

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

**Ryser, E. T.** (2002). Pasteurization of liquid milk products. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 2232-2237). Elsevier Publisher Ltd.:

**Rysstad, G., y Kolstad, J.** (2006). Extended shelf life milk - Advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 85-96.

**Saboya, L. V., Maillard, M. B., y Lortal, S.** (2002). Efficient mechanical disruption of *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* and *Propionibacterium freudenreichii* by a new high-pressure homogenizer and recovery of intracellular aminotransferase activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 1-5.

**Saint Denis, T., Humbert, G., y Gaillard, J. L.** (2001). Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: a revisited study. *Lait*, 81, 715-729.

**Sandra, S., y Dalgleish, D. G.** (2005). Effects of ultra high pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*, 15, 1-10.

**Sandra, S., y Dalgleish, D. G.** (2007). The effect of ultra high-pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. *International Dairy Journal*, 17, 1043-1052.

**Schmidt, D. G.** (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In P. F. Fox, *Developments in Dairy Chemistry* (pp. 61-68). Applied Science Publishers: London, UK.

**Señorans, F. J., Tabera, J., Herraiz, M., y Reglero, G.** (1996). A method for the direct isolation and gas chromatographic analysis of milk flavor components using a programmed temperature vaporizer. *Journal of Dairy Science*, 79, 1706-1712.

**Serra, M., Trujillo, A., Guamis, B., y Ferragut, V.** (2009). Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*, 23, 82-91.

**Serra, M., Trujillo, A., Jaramillo, P. D., Guamis, B., y Ferragut, V.** (2008a). Ultra-High Pressure Homogenization-Induced Changes in Skim Milk: Impact on Acid Coagulation Properties. *Journal of Dairy Research*, 75, 69-75.

**Serra, M., Trujillo, A., Pereda, J., Guamis, B., y Ferragut, V.** (2008b). Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 89, 99-104.

**Serra, M., Trujillo, A., Guamis, B., y Ferragut, V.** (2008c). Study of proteolysis during cold storage of yogurts from ultra-high pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, *Aceptado*.

**Serra, M., Trujillo, A., Guamis, B., y Ferragut, V.** (2008d) Study of flavor compounds and survival of starter cultures of yogurts produced from ultra-high-pressure-homogenized milk. *International Dairy Journal*, En prensa, doi:10.1016/j.idairyj.2008.08.002

**Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Ferragut, V.** (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows`milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*, 17, 782-790.

**Shakeel-ur-Rehman y Farkye, N. Y.** (2004a). Lactoperoxidase. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 938-941). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

**Shakeel-ur-Rehman y Farkye, N. Y.** (2004b). Lipases and Esterases. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 926-941). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

**Shakeel-ur-Rehman y Farkye, N. Y.** (2004c). Phosphatases. In H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 934-938). Elsevier Publisher Ltd.: New York, EEUU.

**Shakeel-ur-Rehman, Fleming, C. M., Farkye, N. Y., y Fox, P. F.** (2003). Indigenous phosphatases in milk. In P. F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1: Proteins* (pp. 524-543). Elsevier Publisher Ltd.: London, UK.

**Shindler, J. S., Childs, R. E., y Bardsley, G.** (1976). Peroxidase from Human Cervical Mucus. *European Journal of Biochemistry*, 65, 325-331.

**Shirgaonkar, I. Z., Lothe, R. R., y Pandit, A. B.** (1998). Comments on the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure and high-speed devices. *Biotechnology Progress*, 14, 657-660.

**Siddiqi, S. F., Titchener-Hooker, N. J., y Shamlou, P. A.** (1997). High pressure disruption of yeast cells: the use of Scale Down Operations for the Prediction of Protein Release and Cell Debris Size Distribution. *Biotechnology and Bioengineering*, 55, 642-649.

**Simon, M., y Hansen, A. P.** (2001). Effect of various dairy packaging on the shelf life and flavor of ultrapasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, 84, 784-791.

**Singh, H.** (1995). Heat-induced changes in casein, including interactions with whey proteins. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 86-104). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.

**Smiddy, M. A., Martin, J. E., Huppertz, T., y Kelly, A. L.** (2007). Microbial shelf life of high pressure homogenised milk. *International Dairy Journal*, 17, 29-32.

**Solano-López, C. E., Ji, T., y Alvarez, V. B.** (2006). Volatile Compounds and Chemical Changes in Ultrapasteurized Milk Packaged in Polyethylene Terephthalate Containers. *Journal of Food Science*, 70, 407-412.

**Sorensen, A. M., Baron, C. P., Let, M. B., Bruggemann, D. A., Pedersen, L. R. L., y Jacobsen, C.** (2007). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Oxidation linked to changes in protein composition at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1781-1789.

**Sorhaug, T., y Stepaniak, L.** (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 35-41.

**Srinivasan, M., y Lucey, J. A.** (2002). Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, 85, 1070-1078.

**Stapelfeldt, H., Nielsen, K. N., Jensen, S. K., y Skibsted, L. H.** (1999). Free radical formation in freeze-dried raw milk in relation to its  $\alpha$ -tocopherol level. *Journal of Dairy Research*, 66, 461-466.

**Statistical Analysis Systems Institute.** (2004) User's guide. SAS Institute Inc., Cary, N.C (Versión 9.1.3).

**Stepaniak, L. y Sorhaug, T.** (1995). Thermal denaturation of bacterial enzymes in milk. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 349-363). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.

**Swaigood, H. E.** (2000). Características de la leche. In O. W. Fennema, *Química De Los Alimentos* (pp. 996-1035). Ed Acribia: Zaragoza, España.

**Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., y Cheftel, J. C.** (2003). High pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13, 427-439.

- Toso, B., Procida, G., y Stefanon, B.** (2002). Determination of volatile compounds in cows milk using headspace GC-MS. *Journal of Dairy Research*, 69, 569-577.
- Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., y Fliss, I.** (2002). Inactivation of Foodborne Pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65, 345-352.
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., y Martínez-Castro, I.** (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, 72, 51-58.
- Vallejo-Cordoba, B., Mazorra-Manzano, M. A., y Gonzalez-Cordoba, A. F.** (2004). New capillary electrophoresis method for the determination of furosine in dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5787-5790.
- van Boekel, M. A. J. S. y Walstra, P.** (1995). Effect of heat treatment on chemical and physical changes to milkfat globules. In P. F. Fox, *Heat-Induced Changes in Milk* (pp. 51-65). International Dairy Federation: Brussels, Belgium.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., y Guerzoni, M. E.** (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 123-135.
- Vazquez-Landaverde, P. A., Torres, J. A., y Qian, M. C.** (2006a). Effect of High-Pressure-Moderate Temperature Processing on the Volatile Profile of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9184-9192.
- Vazquez-Landaverde, P. A., Torres, J. A., y Qian, M. C.** (2006b). Quantification of trace volatile sulfur compounds in milk by solid phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Dairy Science*, 89, 2919-2927.
- Vazquez-Landaverde, P. A., Velazquez, G., Torres, J. A., y Qian, M. C.** (2005). Quantitative determination of thermally derived off flavor compounds in milk using solid phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 88, 3764-3772.
- Verwer, R. W. H., Nanninga, N., Keck, W., y Schwarz, U.** (1978). Arrangement of glycan chains in the Sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 136, 723-729.
- Villamiel, M., Lopez Fandiño, R., Corzo, N., y Olano, A.** (1997). Denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin and native enzymes in the plate exchanger and holding tube section during continuous flow pasteurization of milk. *Food Chemistry*, 58, 49-52.
- Walstra, P. y Jennes, R.** (1984a). Caseins. In P. Walstra & R. Jennes, *Dairy Chemistry and Physics* (pp. 229-253). John Wiley & Sons, Inc.: New York, EEUU.
- Walstra, P. y Jennes, R.** (1984b). Outline of milk composition and structure. In P. Walstra & R. Jennes, *Dairy Chemistry and Physics* (pp. 1-11). John Wiley & Sons, Inc.: New York, EEUU.
- Walstra, P. y Jennes, R.** (1984c). Rheological properties. In P. Walstra & R. Jennes, *Dairy Chemistry and Physics* (pp. 290-300). John Wiley & Sons, Inc.: New York, EEUU.
- Walstra, P., Wouters, J., y Geurts, T.** (2006a). Heat treatment. In P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Dairy Science and Technology* (pp. 225-272). CRC Press: Boca Ratón, EEUU.

**Walstra, P., Wouters, J., y Geurts, T.** (2006b). Microbiology of milk. In P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Dairy Science and Technology* (pp. 175-203). CRC Press: Boca Ratón, EEUU.

**Walstra, P., Wouters, J., y Geurts, T.** (2006c). Milk components. In P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Dairy Science and Technology* (pp. 17-108). CRC Press: Boca Ratón, EEUU.

**Walstra, P., Wouters, J., y Geurts, T.** (2006d). Milk for liquid consumption. In P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Dairy Science and Technology* (pp. 421-445). CRC Press: Boca Ratón, EEUU.

**Walstra, P., Wouters, J., y Geurts, T.** (2006e). Milk properties. In P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Dairy Science and Technology* (pp. 159-174). CRC Press: Boca Ratón, EEUU.

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

**Ye, A., Anema, S. G., y Singh, H.** (2004). High-Pressure-Induced interactions between milk fat globule membrane proteins and skim milk proteins in whole milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 4013-4022.

**Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., y Trujillo, A.** (2007). Effects of Ultra High Pressure Homogenization on the Cheese-Making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 13-23.

# SECCIÓN VII

---

**Anexos**





*Artículo 6*

**7.1 HEAT DAMAGE EVALUATION IN ULTRA-HIGH PRESSURE  
HOMOGENIZED MILK**

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.  
*Food Hydrocolloids*, En revisión.



1 **Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk**

2

3 **J. Pereda, V. Ferragut, J. M. Quevedo, B. Guamis, A. J. Trujillo<sup>1</sup>**

4 Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XaRTA,  
5 XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,  
6 Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Spain)

7

8 Corresponding author: Dr. Antonio José Trujillo.

9 Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XaRTA,  
10 XiT, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,  
11 Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Spain)

12

13 Telephone: +34.935813292

14 Fax: +34.5812006

15 e-mail: [Toni.Trujillo@uab.es](mailto:Toni.Trujillo@uab.es)

16

17 **ABSTRACT**

18 The evaluation of heat damage in ultra high-pressure homogenized (UHPH)-treated  
19 samples has been studied by analyzing different thermal indicators such as compounds  
20 that absorb at 340 nm, hydroxymethylfurfural, total sulphydryl content, furosine,  
21 lactulose and whey protein denaturation. Milk was treated at 200-300 MPa with inlet  
22 temperature of 30-40°C and was compared to high-pasteurized milk (PA; 90°C, 15 s)  
23 and to commercial UHT, in bottle-sterilized and pasteurized milks. UHPH samples were  
24 differentiated from PA milk, basically by the determination of Absorbance 340 nm and

---

<sup>1</sup> Corresponding autor: [Toni.Trujillo@uab.es](mailto:Toni.Trujillo@uab.es)

25  $\beta$ -Lactoglobulin denaturation. Both parameters indicated a reduced thermal effect in  
26 UHPH samples over PA milk. Comparison of UHPH samples with UHT and sterilized  
27 milks showed an increase of all heating indicators when severe heat process was  
28 applied.

29 Overall, in spite of the increase of temperature during UHPH treatments, heat damage  
30 was lower compared to PA milk, suggesting the potential of this technology as an  
31 alternative to pasteurization.

32

### 33 ***Keywords***

34 Lactulose, furosine, hydroxymethylfurfural, whey protein denaturation, sulphhydryl  
35 groups, Ultra-high pressure homogenization, thermal indicators, Maillard reaction.

36

### 37 **1. Introduction**

38 Milk is a nutritious medium that presents a favourable environment for the growth of  
39 spoilage and pathogenic microorganisms. Consequently, many thermal treatments are  
40 applied to milk in order to extend its conservation. However, when milk is subjected to  
41 heat treatments, diverse physicochemical, nutritional and organoleptic changes occur in  
42 it and the extent of these changes depends on the temperature and duration of heating  
43 (Guingamp, Humbert, Midon, Nicolas & Linden, 1999). Whey protein denaturation,  
44 products of lactose isomerization and degradation such as lactulose and products of  
45 Maillard browning such as furosine and hydroxymethylfurfural (HMF) are the most  
46 important and undesirable consequences of thermal treatment (Guingamp et al., 1999).  
47 In general, the assessment of only one indicator does not allow distinguishing between a  
48 prolonged heat treatment at low temperature and a short heat treatment at high  
49 temperature, therefore, more than one indicator should be used. The Maillard reaction is

50 a complex set of reactions between primary amino groups and reducing carbohydrates,  
51 that takes place during processing and storage of most foods and cause deterioration of  
52 their nutritive value (Morales & Jimenez-Perez, 1998b). Especially in dairy products,  
53 the Maillard reaction generates a reduction of the nutritive value due to the formation of  
54 protein-bound Amadori product (lactulosyl lysine) formed by reaction of lactose and the  
55  $\epsilon$ -amino group of lysine in the first stage of the reaction, almost selectively blocking the  
56 lysine residues during industrial treatments of milk (Morales & Jimenez-Perez, 1998a).  
57 Hence, uncontrolled Maillard reactions may compromise the nutritional value of milk  
58 through the destruction of essential aminoacids and vitamins and by limiting the  
59 bioavailability of other amino acids. Nowadays, consumers demand fresh and safe foods  
60 with good sensory properties and also with a considerable shelf-life, but, it is difficult  
61 for the industry to satisfy all these requirements at the same time by using a thermal  
62 treatment. For this reason, in recent years the replacement of traditional food  
63 preservation technologies such as heat treatment by new preservation techniques has  
64 started to be investigated. One of these technologies that is being studied is ultra-high  
65 pressure homogenization (UHPH) which is based on the same principle as conventional  
66 homogenization but works at higher pressures (up to 400 MPa). Since the first reported  
67 study on the use of high pressure homogenization as a tool for food preservation  
68 (Popper & Knorr, 1990), several works on UHPH milk treatment have been published.  
69 Reports of microorganisms inactivation in milk have demonstrated the efficiency of  
70 UHPH treatments to reduce microbial counts and to obtain a microbial shelf-life similar  
71 to that of high-pasteurized milk (Pereda, Ferragut, Quevedo, Guamis & Trujillo, 2007;  
72 Picart, Thiebaud, René, Guiraud, Cheftel & Dumay, 2006). However, to evaluate the  
73 adequacy of a process used in the dairy industry, knowledge of the process impact, not  
74 only in terms of food safety but also in terms of quality on milk, is required. Thus,

75 different authors have studied the effect of UHPH on enzymes inactivation (Hayes &  
76 Kelly, 2003; Pereda et al., 2007), on changes in protein structure (Hayes, Fox & Kelly,  
77 2005), on the reduction of fat globule size (Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud &  
78 Cheftel, 2003; Pereda et al., 2007) and on the flavour profile (Pereda, Jaramillo,  
79 Quevedo, Ferragut, Guamis & Trujillo, 2008). As a summary, UHPH is a technology  
80 that can ensure a perfect microbiological safety of the product with physicochemical  
81 and sensory characteristics similar to those of conventional pasteurized milk. Although  
82 UHPH is described as a non-thermal technology, during UHPH treatments an increase  
83 in milk temperature ( $\sim 19^{\circ}\text{C}$  per 100 MPa) is produced as a consequence of the adiabatic  
84 heating generated in the machine in addition to the high turbulence, shear and cavitation  
85 forces that the fluid suffers in the homogenization valve (Thiebaud et al., 2003). Once  
86 treated, the fluid is quickly cooled by passing through heat exchangers, so the holding  
87 time at the higher temperature is very short  $\sim 0.2\text{-}0.7$  s (Pereda et al., 2007; Picart et al.,  
88 2006) depending on the characteristics of the UHPH equipment and heat exchangers  
89 used. Hence, the purpose of this work has been to study the effect of this increase in  
90 milk temperature during UHPH treatment on different thermal indicators and compare  
91 these results with those obtained using conventional heat treatments.

92

## 93 **2. Material and Methods**

### 94 *2.1 Supply and treatment of Milk*

95 Fresh raw bovine milk was obtained from a local dairy farm (Can Badó, Barcelona,  
96 Spain), and after fat standardization at  $3.5 \pm 0.2$  % it was kept overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Milk  
97 was subjected to UHPH treatments at 200 and 300 MPa with inlet temperatures of 30  
98 and  $40^{\circ}\text{C}$  by using a Stansted high-pressure homogenizer (model FPG11300, Stansted  
99 Fluid Power Ltd., Essex, UK) which is able to support up to 400 MPa and works with a

100 flow rate of 120 l/h. The inlet temperatures of milk were reached by passing milk  
101 through a heat exchanger located behind the feeding tank. To minimize the thermal  
102 effect generated by UHPH treatment, two spiral type heat-exchangers (Garvía,  
103 Barcelona, Spain) located behind the second valve were used in order to reduce the  
104 holding time ( $< 0.7$  s) at the highest temperature. During treatments, the inlet  
105 temperature ( $T_i$ ), the temperature before the first homogenization valve ( $T_1$ ), the  
106 temperature before the second homogenization valve ( $T_2$ ), as well as the final  
107 temperature of the milk after passing through the heat exchanger ( $T_f$ ), were monitored.  
108 Ultra-high pressure-treated samples were compared with a high-pasteurized milk (PA).  
109 Two-stage homogenization (18 MPa plus 2 MPa) and pasteurization (90°C for 15 s) of  
110 raw milk were carried out with a Niro Soavi homogenizer (model X68P, Parma, Italy)  
111 and a Finamat heat exchanger (model 6500/010, Gea Finnah GmbH, Ahaus, Germany),  
112 respectively.  
113 Milk samples were collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until laboratory analyses. The  
114 indicators of heat damage of UHPH-treated milk were also compared with those of  
115 commercial high-pasteurized, UHT and in-bottle sterilized milk samples.

116

## 117 *2.2 Evaluation of heat damage*

### 118 *2.2.1 Measurement of the absorbance 340 nm ( $A_{340}$ )*

119 Determination of coloured compounds from non enzymatic browning, which absorb at  
120 340 nm, was performed in triplicate according to the protocol described by Guingamp et  
121 al. (1999). A 2.4 ml of clarifying reagent ® (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) was  
122 added to 1.5 ml of milk:water (1:1, v/v), the mixture was shaken and incubated for 8  
123 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , and then absorbance was measured at 340 nm against a blank containing  
124 water instead of milk. Results are expressed as absorbance units at 340 nm.



125

### 126 *2.2.2 Determination of hydroxymethylfurfural*

127 Determination of HMF was performed following the method B described by Keeney &  
128 Bassette (1959). To measure free plus potential HMF from browning intermediates  
129 (total HMF) 5 ml of oxalic acid 0.3 N were added to 10 ml of milk and the tube was  
130 covered with an inverted beaker and placed in boiling water bath for 1 h, after which it  
131 was cooled. Then, 5 ml of 40% trichloroacetic acid were added and the mixture was  
132 filtered through Whatman paper n° 42. An aliquote of filtrate (4 ml) was placed in a  
133 tube with 1 ml of 0.05 M thiobarbituric acid and then it was heated at 40°C during 30-40  
134 min in a water bath. Once cooled absorbance was measured at 443 nm against a blank  
135 prepared in the same way as the sample, but substituting water for milk.

136 In order to estimate the free HMF the heating step in boiling water has to be omitted.

137 Each sample was analyzed in triplicate and results were expressed as micromoles HMF  
138 per liter of milk.

139

### 140 *2.2.3 Determination of total sulphhydryl content*

141 Total sulphhydryl (SH) content was determined according to the method described by  
142 Guingamp, Humbert & Linden (1993) consisting in use of the Ellman's procedure and  
143 clarifying reagent, allowing that the spectrophotometric measurements can be  
144 performed directly in milk without other sample treatment. All samples were analyzed  
145 in triplicate and results were expressed in micromoles of SH per gram of non-fat dry  
146 solids.

147

### 148 *2.2.4 Furosine analysis*

149 To determine the content of furosine a microwave hydrolysis of 4 ml with 12 ml of 10.6  
150 N HCl was performed according to the microwave conditions specified by Acquistucci,  
151 Panfili & Marconi (1996). After this, the obtained hydrolysate was filtered and then  
152 purified on an Octadecyl C18/18% MiniSpe-ped (Applied Separations, Allentown, PA,  
153 USA) cartridge. Furosine contained in the purified hydrolysate was analyzed in  
154 duplicate by reversed phase (RP)-HPLC with a Summit ×2 dual gradient HPLC system  
155 (Dionex, Idstein, Germany) and using a C8 Alltech Furosine-dedicated column (250 x  
156 4.6 mm; Alltech, Laarne, Belgium) according to the chromatographic conditions  
157 established in the International Dairy Federation (IDF) Standard 193 (IDF , 2004).  
158 Quantification was performed according to the external standard method using a  
159 commercial standard of furosine (Neosystem, Strasbourg, France). Formation of  
160 furosine is highly dependent on protein concentration; therefore, data were expressed as  
161 milligrams per 100 g of protein.

162

#### 163 *2.2.5 Determination of lactulose*

164 Sample preparation was performed according to the official IDF method Standard 175  
165 (IDF, 1995) and lactulose was determined spectrophotometrically at 340 nm using a  
166 fluid combined D-glucose/D-fructose test (Scil Diagnostics, Vierheim, Germany).  
167 Analyses were done in duplicate for each milk sample and results were expressed as  
168 milligrams lactulose per liter of milk.

169

#### 170 *2.2.6 Whey proteins*

171 Reversed phase HPLC analysis of milk whey was performed using a Summit ×2 dual  
172 gradient HPLC system (Dionex, Idstein, Germany). Separations were carried out in a  
173 250 × 4.6 mm column packed with C8-bonded silica gel with a particle diameter of 5

174  $\mu\text{m}$  and pore width of 3,000 nm (Tracer Excel, Teknokroma, Sant Cugat del Vallés,  
175 Spain) at a constant temperature of 40°C, following the method of Resmini, Pellegrino,  
176 Andreini & Prati (1989). Residual levels of  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La) and  $\beta$ -Lactoglobulin  
177 ( $\beta$ -Lg) were quantified using calibrations curves for  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg in the range of 0 –  
178 2000 mg/l.

179

### 180 *2.3 Statistical analysis*

181 Results were analyzed by an Analysis of Variance ANOVA using the general linear  
182 models procedure of Statistical Analysis System (SAS, 2004). The Student-Newman-  
183 Keuls test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a  
184 significant level of  $P < 0.05$ .

185

## 186 **3. Results and discussion**

187 The milk temperatures measured for the conditions used in this study are shown in  
188 Table 1. Treatments performed at 300 MPa at both inlet temperatures were the most  
189 intense UHPH treatments, reaching temperatures above that of high-pasteurization  
190 treatment (90°C). Though, it is important to point out that immediately after reaching  
191 T2, milk was quickly cooled by passing through two heat exchangers and, consequently,  
192 the holding time at the higher temperature T2 was very short ( $< 0.7$  s).

193 Measurement of the  $A_{340}$  can be used as a thermal index for drinking milk. The coloured  
194 compounds from non enzymatic browning, such as melanoidins and humic acids, are  
195 those that absorb at 340 nm. Data presented in Table 2 show that UHPH-treated samples  
196 had lower  $A_{340}$  values compared to PA milk, which were also lower compared to  
197 commercial milk samples analyzed in our laboratory (sterilized: 0.307, UHT: 0.269,  
198 pasteurized: 0.241). Guingamp et al. (1999) found a good correlation between lactulose

199 and  $A_{340}$  contents, and later Morales, Romero & Jiménez-Pérez (1997) reported a good  
200 correlation between  $A_{340}$  and parameters such as the loss of available lysine, or free  
201 fluorescent intermediary compounds formed in the Maillard reactions.

202 Hydroxymethylfurfural is described as an indicator for the advanced stage in the  
203 Maillard reaction. However, total and free HMF have different formation pathways.

204 Free HMF is produced by the Maillard reaction through the decomposition of the  
205 Amadori product lactulosyllysine, while total HMF may also be formed by the acid-  
206 catalyzed degradation of lactose via 3-deoxyosulose. Thus, the use of total HMF as a  
207 specific index of the extent of the Maillard reaction in milk is limited and it should be  
208 used as an index for heat-induced changes in milk, while free HMF should be used as an  
209 index of the extent of the Maillard reaction. No significant differences were observed in  
210 relation to free HMF between UHPH and PA milk, while with respect to total HMF,  
211 300 MPa treated samples and PA milk showed higher HMF content compared to 200  
212 MPa samples. As can be seen in Table 2, the formation of free HMF was small  
213 compared with total HMF. The same phenomenon but more pronounced was observed  
214 by Morales & Jimenez-Perez (1999) who suggested that free HMF is not a reliable  
215 measure for the occurrence of the Maillard reaction. This difference between the level  
216 of free and total HMF can be better appreciated in samples with high content of HMF  
217 such as commercial sterilized and UHT milk. By comparing UHPH samples with  
218 commercial milks it is noticeable that the effect of the increase of temperature generated  
219 during UHPH treatments in relation to HMF formation can be compared with the effect  
220 of a high pasteurization treatment, but not with the thermal effect produced by UHT or  
221 sterilization processes which produce two and six times more HMF, respectively.

222 Values of total HMF similar to those obtained in the present study have been reported

223 by different authors in pasteurized, sterilized and UHT milk (Keeney & Bassette, 1959;  
224 Morales & Jimenez-Perez, 1999).

225 In relation to sulphhydryl groups, as can be seen in Table 2, the values decreased in 200  
226 MPa milk samples and in PA milk compared to unheated milk, nevertheless, a  
227 surprising result was obtained concerning 300 MPa samples. At this pressure, higher  
228 temperature is achieved during treatment compared to 200 MPa, nevertheless, higher  
229 content of total SH groups compared to 200 MPa and PA milk were detected. It has  
230 been described that in raw milk most of the SH groups are masked and undetectable  
231 because they are sequestered within the interior of globular proteins such as  $\beta$ -Lg.  
232 During milk processing, homogenization disrupts fat globules, decreasing size and  
233 increasing the surface area while heat treatment of milk causes whey proteins to  
234 denature and to expose the SH masked groups which are then oxidized to form  
235 disulphide bonds with other proteins in the newly created fat globules (Owusu-Apensen,  
236 2005). This is the reason why heat treatments decrease values of total SH groups  
237 compared with those of raw milk. The increase in total SH groups at 300 MPa could be  
238 explained in different ways. In the first place, different authors (Pereda et al., 2007;  
239 Thiebaud et al., 2003; Hayes et al., 2005) have observed an increase in the particle size,  
240 specially in the  $D_{4,3}$  value, of samples treated at 300 MPa. This increase in the  $D_{4,3}$ ,  
241 parameter, which is very sensitive to the presence of small amounts of large particles,  
242 indicates the formation of clusters of fat globules, which lead to less interfacial area on  
243 which denatured whey protein, specially  $\beta$ -Lg, might interact with original membrane  
244 proteins and caseins through disulphide bonds. Also, if clusters are formed through  
245 shared casein adsorbed onto the fat surface, the protein could be entrapped between a  
246 group of fat globules instead of being positioned on the surface of the fat globule and  
247 therefore, the accessibility of the denatured  $\beta$ -Lg to caseins could be partially restricted

248 due to steric impediment. On the other hand, pressure by homogenization at high  
249 pressures could produce conformational changes in whey proteins making more  
250 difficult the access to masked SH groups.

251 When we compared UHPH-treated milk with commercial milk samples it was found  
252 that SH content is much lower in sterilized and UHT milk (0.27  $\mu\text{mol/g}$  nonfat dry  
253 milk) than in UHPH milk samples. This is related to the great difference in the degree of  
254 denatured whey proteins (27.3 and 0.6 mg/100 ml of  $\alpha$ -La and 27.5 and 0.33 mg/100 ml  
255 of  $\beta$ -Lg, for UHT and sterilized milk, respectively) which leads to more exposed SH  
256 groups that can participate in disulphide bonds. Also, protein-bound sulphhydryls can  
257 also be converted into volatiles such as hydrogen sulphide, methanethiol, dimethyl  
258 sulphide and dimethyl disulphide, although in general, only a minor fraction of these SH  
259 groups participate in sulphur volatile compounds (De Wit & Nieuwenhuijse, 2008).

260 Ultra-high pressure homogenized samples showed no significant differences in furosine  
261 content compared to PA milk, and values were within the range detected by the  
262 interlaboratory test organized within the Dairy expert group of the EU Commission in  
263 pasteurized milk (IDF, 2004). Moreover, quantifiable amounts of furosine were  
264 detectable in raw milk probably due to sugar-protein interaction during milk synthesis  
265 (Resmini, Pellegrino & Battelli, 1990). Data of furosine were also determined in  
266 commercial milk samples and were compared to UHPH-treated milk and with the PA  
267 milk produced in our pilot plant. Data shown that furosine, the main stable Amadori  
268 compound in the early Maillard reaction, can be used as an indicator of the heat damage  
269 of milk and for the distinction of UHT, sterilized and pasteurized milk. The low level of  
270 furosine found in PA and UHPH milk (8.5-9 mg/ 100 g protein) increased up to 16  
271 mg/100 g protein in commercial PA milk and 166 mg/100 g protein in UHT milk  
272 reaching about 315 mg/100 g protein in sterilized milk. The concentration of 16 mg/100

273 g protein in commercial pasteurized milk sample is not typical for pasteurized milk, and  
274 two different reasons can be suggested in order to explain this unusual furosine  
275 concentration. In the first place, probably more intense temperature/time conditions are  
276 applied in the industry in order to obtain milk with longer shelf-life, and the other  
277 possibility, that has been suggested by Vallejo-Cordoba, Mazorra-Manzano &  
278 Gonzalez-Cordoba (2004), consists of the addition of dry milk to the fluid pasteurized  
279 milk. Special attention should be paid to samples with unusual furosine content, because  
280 it could indicate adulteration of milk derivatives with reconstituted dried milk,  
281 overprocessing and subsequently reduced nutritional value due to the loss of available  
282 lysine.

283 As can be seen in Table 2, lactulose was only detected in PA milk and in UHPH-treated  
284 milk at 300 MPa 40°C. The detection limit of the method used to determine lactulose is  
285 approximately 10 mg/l milk (De Block, Merchiers, Van Renterghem & Moermans,  
286 1996), which indicates that the level of lactulose in UHPH samples treated at 200 MPa  
287 and sample treated at 300 MPa 30°C is lower than 10 mg/l because it could not be  
288 detected in the present study. On the other hand, levels of lactulose in commercial milk  
289 samples were much higher. This is in accordance with the opinion of the European  
290 Union Expert Group on Dairy Products who stated that significant amounts of lactulose  
291 should not be formed during the high-pasteurization process in contrast to the UHT  
292 treatment in which an upper limit of 600 mg lactulose/l milk has been proposed to  
293 distinguish between UHT and sterilized milks. The values found in commercial samples  
294 reached 886 mg/l in sterilized milk, 438 mg/l in UHT milk and 31 mg/l in PAc. Besides  
295 being within the limits established, these values were similar to those reported by other  
296 authors (Marconi et al., 2004).

297 By analyzing the furosine/lactulose ratio in all treated samples we observed that the  
298 milder the heating, the higher the furosine/lactulose ratio, which means, the importance  
299 of Maillard reaction over lactose isomerization is higher. Under the most severe heating  
300 conditions of milk, lactulose could be easily quantified; on the contrary, due to the low  
301 sensitivity of the determination of lactulose, under mild heating conditions only the  
302 early Maillard reaction extent can be quantified accurately.

303 Other index to evaluate the effect of heat treatment was the degree of denaturation of  
304 whey proteins (Table 2). No statistical differences in the degree of  $\alpha$ -La denaturation  
305 were found between UHPH (10-17% of denaturation) and PA milk (20%) while in the  
306 case of total  $\beta$ -Lg a statistical difference was detected between UHPH (32-37 % of  
307 denaturation) and PA milk (47%), showing that denaturation of  $\beta$ -Lg was more  
308 important than that of  $\alpha$ -La, and also that  $\beta$ -Lg was more drastically denatured by the  
309 conditions used in the thermal treatment than by pressure homogenization. This is in  
310 accordance with the results presented by Zamora, Ferragut, Jaramillo, Guamis &  
311 Trujillo (2007) in cheese whey from milk treated at 300 MPa. However, it is important  
312 to point out that in UHPH, simultaneous heating and homogenization processes exist.  
313 Values of  $\beta$ -Lg denaturation obtained in the present study were too excessively elevated  
314 to be attributed only to the thermal effect. In fact, Hayes et al. (2005) treating warmed  
315 milk up to 250 MPa that reached  $T_2 = 83.6^\circ\text{C}$ , suggested that the physical forces  
316 experienced by whole milk during UHPH also denatured  $\beta$ -Lg. Our results showed that  
317 the amount of denatured  $\beta$ -Lg in 200 MPa at  $T_i = 30^\circ\text{C}$ , which reached  $T_2 = 78.5^\circ\text{C}$  for  
318 less than 1 s, was  $\sim 32\%$ , whereas  $\sim 8\%$  of  $\beta$ -Lg is denatured on heating milk at  $72^\circ\text{C}$   
319 for 15 s (Villamiel, Lopez Fandiño, Corzo & Olano, 1997).

320 Comparison of the thermal stability of the variants of  $\beta$ -Lg was also studied because it  
321 may offer some insight in designing and optimizing the quality and yield of the milk



322 products for the dairy processor. Croguennec, O'Kennedy & Mehra (2004) have found  
323 that bovine  $\beta$ -Lg B is denatured more rapidly than  $\beta$ -Lg A. However, Imafidon, NG-  
324 Kwai-Hang, Harwalkar & Ma (1991) reported that  $\beta$ -Lg B was more heat stable than  $\beta$ -  
325 Lg A in solutions of the isolated proteins. According to Nielsen, Singh & Latham  
326 (1996) these conflicting results on the thermal denaturation of both genetic variants of  
327  $\beta$ -Lg could be explained on the basis of different protein concentrations used by  
328 different authors. Below a protein concentration of 10% the B variant was more  
329 sensitive to thermal treatment than the A variant, whereas above 10%, the A variant  
330 denatured faster than the B. In our study, protein concentration was below 10%, and  
331 data showed that in all UHPH-treated samples and PA milk, except 200 MPa 30°C  
332 sample, higher percentage ( $P < 0.05$ ) of  $\beta$ -Lg A retention were found, which is in  
333 accordance to the explanation given by Nielsen et al. (1996). At 200 MPa 30°C the  
334 same percentage of denaturation was observed for the two variants (~ 31-32%). The  
335 thermal denaturation parameters of both variants has been studied by Huang, Catignani  
336 & Swaisgood (1994) reporting that denaturation temperatures were 82.1 y 87.3°C for  $\beta$ -  
337 Lg A and B, respectively. Higher denaturation temperature for variant B has also been  
338 reported by Imafidon et al. (1991). At 200 MPa 30°C a T2 below the thermal  
339 denaturation temperatures of  $\beta$ -Lg A and B were achieved and probably, as was  
340 commented before, the denaturation of  $\beta$ -Lg in this sample could be due to the physical  
341 forces experienced by the milk during its passage through the high pressure valve.  
342 In comparison to UHPH samples, commercial milk samples showed a much higher  
343 degree of whey protein denaturation. Whey proteins in sterilized milk were almost  
344 completely denatured (>99%) with the thermal conditions applied in this milk sample.  
345 As was observed in the case of furosine and lactulose, when we compared residual  
346 whey proteins in PA milk (110 and 318 mg/ml milk for  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg, respectively) to

347 the commercial pasteurized milk (PAc) (66 and 65 mg/100 ml milk for  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg,  
348 respectively), it is noticeable that the temperature/time applied by the industry during  
349 processing produced more heat damage than that applied in the PA produced in our  
350 pilot plant.

351 In conclusion, when comparing UHPH and conventional heating, no major differences  
352 for any of the heat indicators studied were observed in relation to PA milk; however, as  
353 mentioned before, the conditions of temperature and time used in the industry for high  
354 pasteurized milk are more severe than 90°C for 15 s.

355 Of all the indicators studied, the combination of  $A_{340}$  nm with  $\beta$ -Lg denaturation could  
356 be used to distinguish between UHPH samples (at the conditions of pressure and  
357 temperature used in this study) and PA milk. The main advantage of the proposed  
358 procedure is its simplicity, which leads to a rapid evaluation.

359 It can be concluded that UHPH treated samples, regardless of the increase of  
360 temperature experienced in the UHPH valve, suffered less Maillard reaction, less whey  
361 protein denaturation and no exhibited lactose isomerization compared to a commercial  
362 pasteurized milk which leads to a preservation to essential aminoacids and as a  
363 consequence to a better nutritional value desired by consumers. Knowing that UHPH is  
364 able to produce milk with a microbial and physico-chemical shelf-life and with a  
365 volatile profile similar to that of a PA milk, these results confirm once more that UHPH,  
366 especially treatment at 300 MPa could be used as an alternative to pasteurization  
367 treatment.

368

369 **Acknowledgements**

370 The authors acknowledge the European Union for the financial support given to this  
371 investigation (CRAFT project 512626), and Julieta Pereda acknowledges a predoctoral  
372 fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR).

373

#### 374 **References**

375 Acquistucci, R., Panfili, G. & Marconi, E. (1996). Application of the microwave  
376 hydrolysis to furosine determination in cereal and dairy foods. *Journal of Agricultural*  
377 *and Food Chemistry*, 44, 3855-3857.

378 Croguennec, T., O'Kennedy, B.T. & Mehra, R. (2004). Heat-induced  
379 denaturation/aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates  
380 formed. *International Dairy Journal*, 14, 399-409.

381 De Block, J., Merchiers, M., Van Renterghem, R. & Moermans, R. (1996). Evaluation  
382 of two methods for the determination of lactulose in milk. *International Dairy Journal*,  
383 6, 217-222.

384 De Wit, R. & Nieuwenhuijse, H. (2008). Kinetic modelling of the formation of sulphur-  
385 containing flavour components during heat-treatment of milk. *International Dairy*  
386 *Journal*, 18, 539-547.

387 Guingamp, M.F., Humbert, G. & Linden, G. (1993). Determination of sulfhydryl groups  
388 in milk using Ellman's procedure and clarifying reagent. *Journal of Dairy Science*, 76,  
389 2152-2155.

390 Guingamp, M.F., Humbert, G., Midon, P., Nicolas, M. & Linden, G. (1999). Screening  
391 procedure for evaluating heat load in commercial milks. *Lait*, 79, 457-463.

392 Hayes, M.G., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2005). Potential applications of high pressure  
393 homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 25-33.

394 Hayes, M.G. & Kelly, A.L. (2003). High pressure homogenisation of milk (b) effects on  
395 indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70, 307-313.

396 Huang, X.L., Catignani, G.L. & Swaisgood, H.E. (1994). Relative structural stabilities  
397 of  $\beta$ -lactoglobulins A and B as determined by proteolytic susceptibility and differential  
398 scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1276-1280.

399 IDF. (1995). *Lait. Determination de la teneur en lactulose: Methode*  
400 *enzymatique. NORMA FIL INTERNATIONALE*. Brussels, Belgium.

401 IDF. (2004). *Determination of furosine content - Ion-pair reverse-phase high-*  
402 *performance liquid chromatography method* Brussels, Belgium.

403 Imafidon, G.I., NG-Kwai-Hang, K.F., Harwalkar, V.R. & Ma, C.Y. (1991). Differential  
404 scanning calorimetric study of different genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of*  
405 *Dairy Science*, 74, 2416-2422.

406 Keeney, M. & Bassette, R. (1959). Detection of intermediate compounds in the early  
407 stages of browning in milk products. *Journal of Dairy Science*, 42, 945-960.

408 Marconi, E., Messia, M.C., Amine, A., Moscone, D., Vernazza, F., Stocchi, F. &  
409 Palleschi, G. (2004). Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay.  
410 *Food chemistry*, 84, 447-450.

411 Morales, F.J. & Jimenez-Perez, S. (1998a). Monitoring of Heat Induced Proteolysis in  
412 Milk and Milk-Resembling Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46,  
413 4391-4397.

414 Morales, F.J. & Jimenez-Perez, S. (1998b). Study of Hydroxymethylfurfural formation  
415 from acid degradation of the amadori product in milk-resembling systems. *Journal of*  
416 *Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3885-3890.

417 Morales, F.J. & Jimenez-Perez, S. (1999). HMF formation during heat-treatment of  
418 milk-type products as related to milkfat content. *Journal of Food Science*, 64, 855-859.

419 Morales, F.J., Romero, C. & Jiménez-Pérez, S. (1997). Application of the Clarifying  
420 Reagent index as a heat-induced parameter in commercial milk. *Journal of Food*  
421 *Protection*, 60, 1241-1246.

422 Nielsen, B.T., Singh, H. & Latham, J.M. (1996). Aggregation of bovine  $\beta$ -  
423 lactoglobulins A and B on heating at 75°C. *International Dairy Journal*, 6, 519-527.

424 Owusu-Apensen, R. (2005). Colorimetric analysis of protein sulfhydryl groups in milk:  
425 applications and processing effects. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 45,  
426 1-23.

427 Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2007). Effects of  
428 Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of  
429 Milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1081-1093.

430 Pereda, J., Jaramillo, P.D., Quevedo, J.M., Ferragut, V., Guamis, B. & Trujillo, A.J.  
431 (2008). Characterization of volatile compounds in ultra-high pressure homogenized  
432 milk. *International Dairy Journal*, 18, 826-834.

433 Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J.P., Cheftel, J.C. & Dumay, E. (2006).  
434 Effects of high pressure homogenization of raw bovine milk on alkaline phosphatase

435 and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal  
436 treatments. *Journal of Dairy Research*, 73, 454-463.

437 Popper,L. & Knorr,D. (1990) Applications of High-Pressure Homogenization for Food  
438 Preservation. *Food Technology*. Julio: 84-89.

439 Resmini, P., Pellegrino, L., Andreini, R. & Prati, F. (1989). Determinazione delle  
440 sieroproteine solubili del latte per HPLC. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 40, 7-23.

441 Resmini, P., Pellegrino, L. & Battelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in  
442 milk and dairy products by a direct HPLC method. *Italian Journal of food science*, 3,  
443 173-183.

444 Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P. & Cheftel, J.C. (2003). High pressure  
445 homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and  
446 microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13, 427-439.

447 Vallejo-Cordoba, B., Mazorra-Manzano, M.A. & Gonzalez-Cordoba, A.F. (2004). New  
448 capillary electrophoresis method for the determination of furosine in dairy products.  
449 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5787-5790.

450 Villamiel, M., Lopez Fandiño, R., Corzo, N. & Olano, A. (1997). Denaturation of beta-  
451 lactoglobulin and native enzymes in the plate exchanger and holding tube section during  
452 continuous flow pasteurization of milk. *Food chemistry*, 58, 49-52.

453 Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P.D., Guamis, B. & Trujillo, A. (2007).Effects of  
454 Ultra High Pressure Homogenization on the Cheese-Making properties of milk. *Journal*  
455 *of Dairy Science*, 90, 13-23.

456

Table 1: Temperature changes of milk <sup>A</sup> during Ultra-High Pressure Homogenization treatment.

Ti <sup>B</sup> (°C)	Homogenization pressure (MPa)	T1 <sup>C</sup> (°C)	T2 <sup>D</sup> (°C)	Tf <sup>E</sup> (°C)
30	200	34.5 ± 0.0	78.5 ± 0.6	21.0 ± 0.5
	300	38.0 ± 0.5	95.5 ± 1.0	22.0 ± 1.0
40	200	42.5 ± 0.0	85 ± 1.0	22.0 ± 0.6
	300	44.0 ± 0.6	101.5 ± 1.0	27.0 ± 1.0

<sup>A</sup> All temperature values are means (± standard deviations) of data from 3 independent experiments.

<sup>B</sup> Ti = inlet temperature.

<sup>C</sup> T1 = temperature before the first homogenization valve.

<sup>D</sup> T2 = temperature before the second homogenization valve.

<sup>E</sup> Tf = outlet temperature.

Table 2: Thermal indicators studied in raw and treated milk samples.

	Treatment					
	Raw	200 MPa 30°C	300 MPa 30°C	200 MPa 40°C	300 MPa 40°C	PA <sup>A</sup>
<b>Absorbance 340 nm</b>	0.152 <sup>c</sup> ± 0.056	0.148 <sup>c</sup> ± 0.06	0.168 <sup>b</sup> ± 0.057	0.178 <sup>b</sup> ± 0.033	0.178 <sup>b</sup> ± 0.036	0.201 <sup>a</sup> ± 0.031
<b>HMF free (µmol/l milk)</b>	0.203 <sup>b</sup> ± 0.085	1.040 <sup>a</sup> ± 0.095	1.067 <sup>a</sup> ± 0.195	1.053 <sup>a</sup> ± 0.308	1.026 <sup>a</sup> ± 0.227	0.972 <sup>a</sup> ± 0.170
<b>HMF (µmol/l milk)</b>	0.525 <sup>d</sup> ± 0.214	1.488 <sup>b,c</sup> ± 0.457	2.030 <sup>a,b</sup> ± 0.378	1.313 <sup>c</sup> ± 0.443	1.888 <sup>a,b</sup> ± 0.236	2.202 <sup>a</sup> ± 0.290
<b>Total SH groups (µmol/g nonfat dry milk)</b>	0.958 <sup>a</sup> ± 0.057	0.717 <sup>c</sup> ± 0.127	0.858 <sup>b</sup> ± 0.029	0.691 <sup>c</sup> ± 0.068	0.863 <sup>b</sup> ± 0.064	0.710 <sup>c</sup> ± 0.126
<b>Furosine (mg/100gprotein)</b>	5.32 <sup>b</sup> ± 0.55	8.74 <sup>a</sup> ± 1.97	8.47 <sup>a</sup> ± 1.99	8.99 <sup>a</sup> ± 1.12	9.41 <sup>a</sup> ± 1.76	9.17 <sup>a</sup> ± 2.58
<b>Lactulose (mg/Kg milk)</b>	ND	ND	ND	ND	14.1 <sup>a</sup> ± 4.4	16.5 <sup>a</sup> ± 7.8
<b>α-La (mg/100 ml milk)</b>	127.29 <sup>a</sup> ± 9.39	107.95 <sup>b</sup> ± 1.6	107.08 <sup>b</sup> ± 3.22	114.3 <sup>b</sup> ± 12.55	105.34 <sup>b</sup> ± 3.57	110.25 <sup>b</sup> ± 4.63
<b>β-LgA (mg/100 ml milk)</b>	324.39 <sup>a</sup> ± 44.3	220.84 <sup>b</sup> ± 10.8	220.96 <sup>b</sup> ± 11.83	210.94 <sup>b</sup> ± 40.46	213.87 <sup>b</sup> ± 5.22	198.65 <sup>b</sup> ± 9.15
<b>β-LgB (mg/100 ml milk)</b>	275.38 <sup>a</sup> ± 33.42	189.51 <sup>b</sup> ± 11.77	168.61 <sup>c</sup> ± 7.13	166.58 <sup>c</sup> ± 23.05	161.54 <sup>c</sup> ± 2.44	119.68 <sup>d</sup> ± 11.5
<b>Total β-Lg (mg/100 ml milk)</b>	599.77 <sup>a</sup> ± 76.98	410.35 <sup>b</sup> ± 20.05	389.58 <sup>b</sup> ± 17.77	377.52 <sup>b</sup> ± 63.38	375.41 <sup>b</sup> ± 3.95	318.34 <sup>c</sup> ± 19.36

a, b, c, d Different superscripts for the same parameter indicate significant differences between samples ( $P < 0.05$ ).

<sup>A</sup> PA = High-pasteurized milk (90°C for 15 s)