



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE
LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**“EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES
HIDROSTÁTICAS EN LECHE DE VACA COMO MÉTODO
EQUIVALENTE A LA PASTEURIZACIÓN”**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

Q. en A. ALEJANDRA ELIZABETH ALCÁNTARA ZAVALA

DIRIGIDA POR:

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

**Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2013
México**



Universidad Autónoma de Querétaro.
Facultad de Química.
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

“Evaluación del tratamiento de altas presiones hidrostáticas en leche de vaca como método equivalente a la pasteurización”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q. en A. Alejandra Elizabeth Alcántara Zavala

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

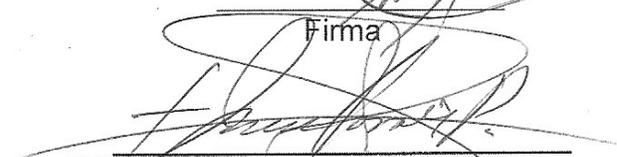
Dr. Jorge Welte Chanes
Co-director

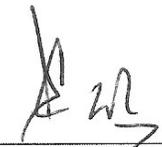
Dra. Blanca García Almendárez
Vocal

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Suplente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente

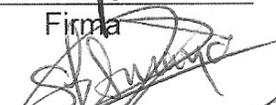

M. en S. P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2013
México

RESUMEN

La alta presión hidrostática (APH) es una tecnología no térmica, su principal ventaja es la inactivación de microorganismos sin alterar las propiedades organolépticas y nutritivas de los alimentos. La leche cruda ha estado implicada en brotes de listeriosis por su deficiente pasteurización, por lo que el objetivo de este trabajo fue procesar leche cruda de vaca con APH y determinar qué condición puede ser la equivalente a la pasteurización. Se realizó un escrutinio de 23 tratamientos en leche UHT entera usando *L. innocua* como subrogado de *L. monocytogenes*; aplicando presiones de 350-600 MPa por tiempos de 0.5-30 min a temperatura ambiente promedio de 28 ± 5 °C, para efectuar la cinética de inactivación. En este trabajo los experimentos se realizaron por duplicado y las determinaciones microbiológicas por triplicado, empleando las normas oficiales Mexicanas. Dos tipos de leche cruda de vaca fueron estudiadas, con y sin inóculo de *L. innocua* (7 Log UFC/ml), determinando microorganismos indicadores [coliformes, bacterias mesófilas aerobias (BMA)] y patógenos (*Salmonella*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*), presiones entre 550 y 600 MPa, por tiempos de 0.5 a 12 min fueron empleados. La condición resultante equivalente a la pasteurización se empleó para procesar leche y realizar un estudio de estabilidad microbiana y fisicoquímica durante 10 días a 4°C empleando leche pasteurizada comercial como control. Ninguno de los tiempos aplicados a 550 MPa logra la inactivación de los patógenos en los dos tipos de leche evaluadas, sin embargo, a 600 MPa por 12 min se logra la ausencia de *Listeria* con una población < 1 Log UFC/ml de coliformes, 2.3 Log UFC/ml de BMA y < 1 Log UFC/ml de *S. aureus*, un contenido microbiano similar al anterior se obtuvo en el estudio de estabilidad de la leche, la cual presentó cambios mínimos de pH y acidez con valores finales de 6.8 y 0.2 % de ácido láctico, respectivamente. El modelo de Gompertz describe mejor a las cinéticas realizadas en leche UHT que el modelo de Weibull. Los resultados obtenidos demuestran que la APH es una alternativa viable para pasteurizar leche cruda e inactivar a *L. monocytogenes*.

(Palabras clave: Altas presiones hidrostáticas, leche, patógenos, pasteurización)

SUMMARY

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal technology whose main advantage is the inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms without altering the organoleptic and nutritional properties of foods. Raw milk has been implicated in outbreaks of listeriosis due to cross contamination or poor pasteurization. Thus, the aim of this work was to pressurize raw cow's milk by HHP and to determine a condition which may be equivalent to pasteurization. A scrutiny of 23 treatments was conducted in whole UHT milk using *Listeria innocua* as surrogate of *L. monocytogenes*. Pressures ranging 350-600 MPa were applied for 0.5-30 min and inactivation kinetics was evaluated. Experiments were performed in duplicate and microbiological determinations in triplicate. Two types of raw cow's milk were studied: with and without inoculum of *L. innocua* (7 Log CFU/ml), followed by determination of indicator organisms (coliforms, mesophilic aerobic bacteria (APC) and the foodborne pathogens *Salmonella*, *L. monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Pressure was applied between 550 and 600 MPa for 0.5-12 min. The condition which resulted equivalent to the pasteurization process was used to treat raw milk and a study was conducted on physicochemical and microbial milk stability during 10 days at 4 °C using commercial pasteurized milk as control. All treatment times at 550 MPa could not achieve pathogens inactivation for both types of evaluated milks. However applying 600 MPa for 12 min to raw milk led to the absence of *Listeria*, <1 Log CFU/ml coliform population, 2.3 Log CFU/ml of APC, <1 Log CFU/ml of *S. aureus*. Similar microbiological conditions were obtained after 10 d at 4 °C, with minimal changes in pH and acidity values, which remained close to 6.8 and 0.2% lactic acid, respectively. The Gompertz model best describes the kinetic studies performed in UHT milk that Weibull model. The results show that HHP is an alternative to pasteurization process in which *L. monocytogenes* is fully inactivated.

(Keywords: High hydrostatic pressure, milk, pathogens, pasteurization

AGRADECIMIENTOS

A la **Conciencia Cósmica Universal (DIOS)** por permitirme realizar y concluir un objetivo más en mi vida profesional, por todas las bendiciones que ha derramado a lo largo de mi existencia y en esta vida, y por las experiencias que me ha permitido tener en ésta.

Al **Programa de Posgrado del Centro de la República** por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de seguir con mi formación profesional.

Le agradezco al **Dr. Carlos Regalado** y a la **Dra. Blanca García** por aceptarme y permitirme trabajar en su grupo de trabajo y contribuir a mi formación académica, compartiendo conocimientos y experiencias, así mismo por sus valiosas aportaciones, orientaciones y retroalimentaciones para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Jorge Welti** por aceptar la colaboración para la realización de esta investigación, le agradezco su orientación y contribuciones realizadas en este proyecto que fueron muy valiosas, y también por su apoyo durante mi estancia en el ITESM.

Al **Dr. Eduardo Castaño** y a la **Dra. Silvia Amaya** por su orientación y aportes realizados en este trabajo.

A todos los **Maestros** y **Doctores** que contribuyeron a mi crecimiento profesional durante mi formación en estos dos años.

Al **CONACYT** por el apoyo otorgado para poder realizar estudios de posgrado.

A mis queridos y amados Padres que son lo más preciado que Dios me ha dado, por brindarme siempre todo su amor, apoyo y lo mejor de ellos para mi realización profesional, por su orientación y compañía en el trayecto de mi vida, gracias.

A Gerardo por ser mi compañero, amigo, consejero y brindarme su apoyo en todo momento a pesar de la distancia.

A mis hermanos por sus buenos consejos, apoyo y amor que me brindan.

A Karen que compartió y me apoyó en la aventura de las duras jornadas de la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Rodrigo, Martha, Teresita, Raquel, Luis, Irais, Eli, Honorio, Víctor, Flor, Aldo, Dra. Elvia, Dianita, Blanca por brindarme su apoyo, amistad, cariño.

A la maestra Ana Chew por su orientación, apoyo y facilitarme material, equipo y el espacio para la realización de mis experimentos.

A Zamantha Escobedo y Viridiana Tejada por su tiempo y apoyo para realizar la presurización de las muestras, así mismo a Claudia Caballero y Dulce Jiménez por su amistad y apoyo para facilitarme material y equipo. Desde luego a Vinicio Serment por compartir sus conocimientos, tiempo y paciencia sobre el modelamiento.

A Cynthia Soria y Mayeli Peralta por su valiosa amistad, apoyo y compañía durante mi estancia en el ITESM.

A todos aquellos que compartimos las aulas durante estos dos años y que me brindaron su amistad, así mismo a aquellas personas que me apoyaron de manera indirecta para realizar este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Leche de bovino	2
2.1.1. Microbiología de la leche	3
2.1.2. Enfermedades asociadas al consumo de leche	5
2.1.3. Listeriosis y <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.1.4. Producción de leche a nivel mundial y nacional	8
2.2. Tratamientos de conservación de la leche	9
2.2.1. Procesos térmicos	9
2.2.2. Tratamientos no térmicos	11
2.3. Altas presiones hidrostáticas	12
2.3.1. Sistemas y Métodos de presurización	13
2.3.2. Equipos de alta presión hidrostática	14
2.4. Aplicaciones de la APH en alimentos	15
2.4.1. Efecto de la APH en los constituyentes de los alimentos	16
2.4.2. Efecto de la alta presión en los componentes de la leche	18
2.4.3. Efecto de la APH en los microorganismos	20
2.5. Legislación de la aplicación de alta presión hidrostática en alimentos	22
2.6. Los modelos matemáticos y sus aplicaciones en la inactivación microbiana por altas presiones hidrostáticas	22
2.6.1. Modelos no lineales	23
2.6.1.1. Modelo de Weibull	23
2.6.1.2. Modelo de Gompertz	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	25

4.1. OBJETIVO GENERAL	25
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	25
5. METODOLOGÍA	26
5.1. Análisis microbiológicos	26
5.1.1. Determinación de microorganismos indicadores	26
5.1.2. Determinación de microorganismos patógenos	27
5.2. Análisis fisicoquímicos	31
5.2.1. Determinación de acidez	31
5.2.2. Medición de pH	31
5.2.3. Determinación de grasa por el método Gerber	31
5.2.4. Prueba Delvotest® para la detección de residuos de antibiótico en leche cruda	32
5.4. Preparación y presurización de las muestras de leche cruda de vaca	32
5.5. Determinación de la estabilidad microbiana de la leche presurizada y viabilidad de <i>L. innocua</i> como microorganismo subrogado de <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda de vaca, procesada bajo la condición de equivalencia a la pasteurización	34
5.6. Cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> como microorganismo subrogado de <i>L. monocytogenes</i> en leche UHT	35
5.6.1. Preparación y presurización de las muestras de leche UHT	35
5.6.2. Modelamiento matemático de la cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> en leche UHT	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Evaluación del efecto del tiempo y presión sobre inactivación microbiana en leche cruda de vaca para establecer la equivalencia a la pasteurización.	37
6.2. Estabilidad microbiana de la leche presurizada y viabilidad de <i>L. innocua</i> como microorganismos subrogado <i>L. monocytogenes</i> en leche procesada bajo la condición de equivalencia a la pasteurización	43
6.3. Cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> como microorganismo subrogado de <i>L. monocytogenes</i>	47
7. CONCLUSIONES	57
ANEXOS	58
8. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de la leche de vaca	2
2	Brotos de listeriosis asociados al consumo de leche cruda y sus derivados	7
3	Principales países productores de leche de bovino	8
4	Estados productores de leche de bovino en México	8
5	Condiciones empleadas para procesar leche de vaca por APH	33
6	Condiciones de presurización evaluadas en la inactivación de <i>L. innocua</i> en leche UHT entera	36
7	Caracterización de la leche cruda (Lote I)	37
8	Caracterización fisicoquímica de la leche cruda (Lote I)	37
9	Caracterización microbiológica de la leche cruda (Lote II)	38
10	Caracterización fisicoquímica de la leche cruda (Lote II)	38
11	Caracterización microbiológica de la leche procesada a 550 MPa	40
12	Caracterización microbiológica de la leche procesada a 600 MPa	41
13	Análisis de <i>Listeria</i> en leche cruda inoculada y procesada a 550 MPa	42
14	Análisis de <i>Listeria</i> en leche cruda inoculada y procesada a 600 MPa	42
15	Caracterización microbiológica de la leche cruda (Lote III)	44
16	Caracterización fisicoquímica de la leche cruda (Lote III)	44
17	Caracterización microbiológica y fisicoquímica de los sistemas evaluados de leche almacenados a 4°C por 10 días	45
18	Análisis de <i>Listeria</i> en leche cruda inoculada, procesada a 600 MPa y almacenada a 4 °C	46
19	Efecto del CUT sobre la población de <i>L. innocua</i>	47

20	Efecto del procesamiento con APH sobre la inactivación de <i>L. innocua</i>	48
21	Parámetros del modelo de Weibull obtenidos para describir la inactivación de <i>L. innocua</i> en leche tratada con APH	53
22	Ecuaciones obtenidas a partir del modelo de Weibull ($\text{Log } N/N_0 = -bt^n$) para describir la inactivación de <i>L. innocua</i> en leche tratada con APH	54
23	Parámetros de la ecuación de Gompertz obtenidos para describir la inactivación de <i>L. innocua</i> en leche tratada con APH	54
24	Expresiones matemáticas obtenidas a partir de la ecuación de Gompertz ($\text{Log } N/N_0 = y_0 + a \cdot \exp(-\exp(-(t-t_0)/b))$) para describir la inactivación de <i>L. innocua</i> en leche tratada con APH.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Equipo de alta presión hidrostática. A la izquierda se muestra un equipo de APH continuo y la derecha un equipo de APH semicontinuo	14
2	Inactivación de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en leche presurizada a 550 y 600 MPa	41
3	Efecto de la alta presión hidrostática en la inactivación de <i>L. innocua</i> en leche UHT entera, en función del tiempo de exposición	49
4	Inactivación de <i>L. innocua</i> a presiones de 350-600 MPa	52
5	Aplicación del modelo de Weibull a la cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> realizada a las presiones de 350-600 MPa	53
6	Aplicación del modelo de Gompertz a la cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> realizada a las presiones de 350-600 MPa	55
7	Aplicación del modelo de Weibull y Gompertz en la cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> a presiones de 350-600 MPa	56

1. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda del consumidor por adquirir alimentos nutritivos y libres de sustancias químicas, ha impulsado al desarrollo de nuevas tecnologías que generen alimentos con las características deseadas. Por lo tanto, han surgido un grupo de nuevas tecnologías conocidas como “Tecnologías Emergentes” dentro de las cuales destaca la Alta Presión Hidrostática (APH). Ésta tecnología ha permitido procesar gran variedad de alimentos en los cuales se ha demostrado que conservan sus propiedades sensoriales y nutritivas; tal es el caso de jugos, néctares, guacamole, salsas, aceitunas, mermeladas, productos cárnicos entre otros. La APH es considerada como un proceso no térmico, puesto que se pueden procesar los alimentos a temperatura ambiente. En contra parte, los procesos térmicos generan alteración de las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos, por lo cual en muchas ocasiones es necesario emplear aditivos químicos que mejoren la calidad del alimento. La leche cuando es sometida a pasteurización, pierde vitaminas, las proteínas sufren alteraciones, además el sabor y el color cambian, mermando su calidad. La leche es considerada un alimento nutritivo y básico en la dieta de la mayoría de las personas. Aunque también la leche ha sido el principal agente causal de listeriosis en humanos por consumirla cruda, mal pasteurizada o bien por derivados de la misma, pues los consumidores no prefieren el sabor de los derivados lácteos sometidos a pasteurización, sino de leche cruda o fresca. La leche contiene una gran cantidad de bacterias entre las cuales pueden estar bacterias benéficas y patógenas, en estas últimas destaca la *Listeria monocytogenes*, que es la causante de la listeriosis. Los procesos de pasteurización de leche deben eliminar éste tipo de bacterias patógenas, sin embargo la APH también tiene la capacidad de hacerlo además de conservar los nutrientes de los alimentos, por lo tanto puede ser una alternativa para procesar leche.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Leche de bovino

La leche es considerada como la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otro animal, excluyendo el calostro (NOM-243-SSA1-2010). El sabor ligeramente dulce es proporcionado por la lactosa y el color puede ser blanco a amarillento por la cantidad de grasa y caseína. Las propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca son: pH de 6.5-6.7, acidez titulable de 15-18 °D (1 °D=0.1 g/l de ácido láctico), densidad (g/cm³) a 15°C de 1.028-1.038, punto crioscópico de -0.53 a -0.55°C (Aranceta y Majem, 2005).

La composición de la leche varía considerablemente según la raza y edad de la vaca, estado de lactancia, alimentación, época del año y salud del animal, sin embargo se han reportado alrededor de más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua en la leche (Wattiaux, 2005). El Cuadro (1) muestra la composición promedio de la leche de vaca, en donde la caseína es la principal proteína que se encuentra dispersa en forma de micelas formando una suspensión coloidal, mientras que la grasa y las vitaminas liposolubles se encuentran dispersas en forma de emulsión; por otro lado la lactosa es el azúcar de la leche y se encuentra disuelta en agua junto con algunos iones como el calcio (Gervilla, 2001). Entre las principales vitaminas que se encuentran en la leche son A, D, E, K, vitaminas del complejo B, vitamina C, ácido fólico entre otras (Miller, 2007).

Cuadro 1. Composición de la leche de vaca.

Nutriente	Cantidad (%)
Agua	88.0
Grasa	3.7
Proteínas	3.4
Carbohidratos(lactosa)	4.8
Minerales	0.72

Adaptado de Wattiaux, (2005)

2.1.1. Microbiología de la leche

La leche es un alimento nutritivo por lo que es considerada un medio muy favorable para la multiplicación de microorganismos. Éste alimento está expuesto a diversas fuentes de contaminación como, la misma vaca, los trabajadores, maquinaria de ordeño, aire, suelo y agua, las cuales son portadores de bacterias que llegan a la leche ocasionando que ésta sea altamente perecedera por lo cual debe ser enfriada a 4°C lo más pronto posible luego de ser obtenida, pues temperaturas superiores a la mencionada generan en mayor medida la multiplicación microbiana provocando en la leche un aumento de acidez mermando su calidad (Estrada y Gutiérrez, 2011). Las bacterias presentes en la leche pueden clasificarse en dos grupos: Bacterias Gram-positivas y Bacterias Gram-negativas, las primeras son aquellas que se tiñen de color azul oscuro o violeta al aplicar la tinción Gram. La estructura de este tipo de bacterias comprende una pared celular gruesa de peptidoglicano que envuelve a la membrana citoplasmática y la función de esta pared es proteger a la bacteria contra ante agentes físicos y químicos (Madigan *et al.*, 2005). Dentro de este grupo bacteriano se encuentran las bacterias lácticas, que son las responsables de fermentar la lactosa en ácido láctico, anaerobias facultativas, la mayor parte de éstas muere por calentamiento de 70-80°C, no son esporuladas. A este grupo pertenecen los géneros de *Micrococcus* y *Streptococcus* los cuales pueden llegar a más del 10 % de la flora total presente en la leche, en ésta también se puede encontrar bacterias del género *Corynebacterium* que tienen forma de bacilo. La leche contiene la bacterias propiónicas que son utilizadas en la elaboración de los quesos tipo Gruyère pues contribuyen a la formación de ojos y a su sabor (Ramírez *et al.*, 2011). También pertenecen al grupo de los Gram positivos bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* siendo así la leche cruda un vehículo de microorganismos patógenos.

Las bacterias Gram-negativas presentan una coloración rosa cuando se les aplica la tinción Gram. Su estructura está conformada de dos membranas lipídicas y una pared fina de peptidoglicano, lo que las hace mucha más susceptibles de ser inactivadas ante agentes físicos y químicos (Prescott *et al.*,

2000). Las bacterias de este grupo que forman parte de la leche por lo general son *Enterobacterias*, las cuales han sido aisladas del intestino de los mamíferos; su presencia en el agua o en la leche se debe a una contaminación de origen fecal. Además indican la higiene con la que se obtiene y manipula la leche, de tal forma que reflejan las buenas prácticas de ordeño y de manufactura. Éstas bacterias son responsables de varias enfermedades de carácter epidémico, en el caso de la leche es *Salmonella* como bacteria entérica a la que se le atribuyen infecciones gastrointestinales. *Escherichia coli* es otro microorganismos de interés en materia de salud pública pues también ocasiona enfermedades gastrointestinales y ha sido aislado de leche al igual que *Klebsiella*. La leche contiene bacterias del género *Pseudomonas* en un 90 % especialmente de *P. fluorescens*, este grupo microbiano tiene capacidad proteolítica y lipolítica (Gervilla, 2001).

Existen normas en México que regulan la calidad microbiológica de la leche cruda, permitiendo una cantidad de bacterias mesófilas aerobias (BMA) <1, 200,000 UFC/ml de tal modo que entre mayor sea su contenido indica mayor riesgo de contaminación por bacterias patógenas, así como el crecimiento de los mismos en los productos derivados de ésta leche (NOM-243-SSA1-2010). Las plantas procesadoras también implementan sus propias especificaciones de calidad microbiológica en la leche cruda, y son motivo de premio y/o castigo al productor, estableciendo < 50,000 UFC/ml de BMA, < 300 UFC/ml de coliformes y < 500,000 células somáticas/ml. Las medidas de control para prevenir la contaminación de la leche cruda más usadas son: Mantener en buen estado de salud a las vacas, tener buenas prácticas de ordeño, desinfectar los equipos y superficies empleados en la obtención de la leche, limpieza y desinfección de las instalaciones, higiene del personal y refrigeración inmediata de la leche a 4°C (Estrada y Gutiérrez, 2011). En cuanto a la presencia de priones en la leche, el Foro Internacional de Enfermedades Transmitidas por Animales (TAF, 2009) concluyó que no existen evidencias epidemiológicas que indiquen que la leche bovina sea un factor de transmisión de encefalopatía espongiforme bovina (“enfermedad de las vacas locas”).

2.1.2. Enfermedades asociadas al consumo de leche

El consumo de leche sin pasteurizar y sus derivados han sido los agentes causales de enfermedades como la infección estreptocócica beta hemolítica, campylobacteriosis, gastroenteritis por *E. coli* enterotoxigénica, enterohemorrágica y enteroinvasiva, fiebre tifoidea, brucelosis, yersiniosis y listeriosis (FDA, 2011). En Querétaro en 2008 la tasa de morbilidad de tuberculosis por 10,000 habitantes fue de 1.15 mientras que en 2009 aumentó a 6.4 (SESEQ, 2011). Así mismo quesos frescos y leche cruda se relacionaron con un brote de tuberculosis en niños de origen mexicano en Nueva York (CDC, 2005), por lo que estudios realizados en Estados Unidos han encontrado que la mayor parte de los casos de tuberculosis por *Mycobacterium bovis* ocurre en personas de origen hispano, sobre todo de procedencia mexicana, y señalan el contacto con animales, la ingestión de leche cruda y de queso fresco como los factores causantes de la enfermedad (McDonald *et al.*, 2005, Harris *et al.*, 2007). Por otra parte, la listeriosis es otra enfermedad transmitida por consumo de leche cruda o mal pasteurizada y sus derivados. El primer brote de listeriosis asociado al consumo de leche cruda fue en Massachusetts en 1983 afectando a 43 personas, de igual forma en Colombia se ha presentado la incidencia de ésta enfermedad siendo la leche cruda el agente etiológico (Carrascal *et al.*, 2007).

2.1.3. Listeriosis y *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno emergente zoonótico que puede transmitirse al hombre por consumo de alimentos contaminados, siendo la leche y sus derivados los más involucrados en los brotes de listeriosis ocurridos a nivel mundial con pérdidas económicas muy significativas (Belalcazar *et al.*, 2005). Ésta bacteria es Gram positiva, no esporulada, anaerobia facultativa, de amplia ubicuidad en el medio ambiente, puede crecer en rangos de pH y temperatura que van desde 4.1-9.6 y 0-45°C respectivamente, una de sus cualidades que implica mayor riesgo en alimentos es su carácter psicrótrofo ya que puede crecer a temperaturas de refrigeración (Chen y Hoover, 2002).

L. monocytogenes es la causante de la enfermedad llamada listeriosis que la contraen principalmente individuos inmunocomprometidos, donde la mayor incidencia es para las mujeres embarazadas, ancianos, personas con déficit de nutrición y con enfermedades crónico degenerativas, entre otras (Carrascal *et al.*, 2007). La listeriosis puede ser de dos tipos: Listeriosis invasiva que usualmente desarrolla en personas con el sistema inmune comprometido, mientras que en las mujeres en gestación la bacteria atraviesa por medio de la placenta ocasionándole septicemia al producto, lo que conlleva a un aborto; en los recién nacidos ocasiona meningitis con una alta probabilidad de muerte. El segundo tipo de listeriosis es no invasiva y la puede contraer el resto de la población, en especial mayores de 60 años, provocándoles fiebre, diarrea, dolor abdominal y gastroenteritis, la enfermedad se puede contraer al consumir $>10^3$ UFC/g ó ml de alimento contaminado (McLauchlin *et al.*, 2004; Health Canada, 2010). La mortalidad por listeriosis es de 25-30 % (Agustín *et al.*, 2001) con una incidencia de 0.25-0.32 casos por cada 100,000 habitantes y una morbilidad 16.4 % (CDC, 2008). *L. monocytogenes* puede contaminar la leche al momento del ordeño así como a los equipos y utensilios implicados en la obtención de la misma (Schobitz *et al.*, 2001), por lo que la leche cruda o mal pasteurizada es un riesgo potencial para los consumidores. En el Cuadro (2) se enlistan algunos brotes de listeriosis ocasionados por su consumo.

Listeria innocua es un microorganismo no patógeno empleado como subrogado de *L. monocytogenes*, ambos microorganismos son muy similares en sus características bioquímicas y de crecimiento, además *L. innocua* es mucho más resistente a pH bajos, secado, calentamiento y tolera altas concentraciones de sal, en comparación con *L. monocytogenes*. Esta resistencia hace que *L. innocua* sea un microorganismo modelo en diversos estudios realizados en plantas procesadoras de alimentos así como en otras investigaciones donde el patógeno *L. monocytogenes* no puede ser empleado (Buzrul y Alpas, 2006). La diferencia genética entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* es que ésta última tiene una delección de 80 kb en el DNA plasmídico que codifica para la resistencia a metales pesados (Buchrieser *et al.*, 2003).

Cuadro 2. Brotes de listeriosis asociados al consumo de leche cruda y sus derivados

Año	Lugar	Número de casos (muerte)	Alimento	Referencia
2001	E. U.	13	Queso fresco tipo Mexicano	Carriedo, (2003)
2002	Canadá	13 (2)	Leche cruda y queso fresco	Pagotto, <i>et al.</i> , (2006)
2003	E. U.	13 (2)	Queso fresco tipo Mexicano	Boggs <i>et al.</i> , (2001)
2006	Suiza	-	Leche cruda y derivados lácteos	EFSA, (2007)
2007	Noruega	21 (5)	Leche cruda y queso hecho de leche cruda.	EFSA, (2009)
2007	E.U.	5 (3)	Leche saborizada pasteurizada y no pasteurizada	Cuming <i>et al.</i> , (2008)
2008	Canadá.	21 (1)	Queso hecho de leche cruda	CBC, (2008)
2009-2010	Austria, Alemania, República Checa	34 (8)	Leche cruda, derivados lácteos, se aisló <i>L. monocytogenes</i> de la cuajada ácida de queso “Quargel”	Fretz <i>et al.</i> , (2010)

2.1.4. Producción de leche a nivel mundial y nacional

A nivel mundial, según la FAO la producción de leche aumentará alrededor de 1.9 % que representa 747 millones de tons para el 2014. Alemania, Francia, India, Estados Unidos, Brasil, China entre otros contribuyen con más de dos terceras partes de la producción total ((FAO, 2012), cuadro 3). Por otra parte en México la tendencia en la producción nacional de leche en el 2010 llegó a una cantidad de poco más de 10 millones de litros, siendo el estado de Jalisco el mayor productor, tal y como se observa en el Cuadro (4).

Cuadro 3. Principales países productores de leche bovina

País	Producción (Tons)
Estados Unidos	87,461,300
India	53,030,000
China	36,036,086
Brasil	31,667,600
Alemania	29,628,900
Francia	23,301,200

Adaptado de FAO, (2012)

Cuadro 4. Estados productores de leche bovina en México

Región	Producción (L)
Jalisco	1,960,000
Coahuila	1,243,000
Durango	999,955
Chihuahua	990,995
Guanajuato	775,108

Adaptado de SAGARPA, (2011)

En los meses de julio a septiembre se tiene la mayor producción de leche, debido a las condiciones climáticas que favorecen la alimentación del ganado lechero. El precio de la leche se ha incrementado durante los últimos años por motivos de inflación, a pesar de esto, la leche no ha dejado de ser un alimento que se sigue consumiendo (SAGARPA, 2011). El 30 % de la leche cruda es destinada a la producción de quesos frescos los cuales se expenden en mercados nacionales y locales (SESEQ, 2011), por lo que la leche es y seguirá siendo un producto muy consumido, mientras que a nivel mundial la producción de derivados lácteos como el queso y mantequilla tienen una marcada proyección a crecer un 20 % para los próximos años por lo que la producción de leche va a la alza (FAO,

2006). La producción anual de leche de vaca en México representa aproximadamente \$ 53.030 billones de pesos lo cual tiene un impacto relevante en el sector económico del país (SIAP, 2011). El consumo de leche en México está ligado al ingreso, precios y preferencias de los consumidores, en el año 2012 el consumo de leche fue de 4,491 millones de litros, donde el consumo per cápita es de 38.9 litros por año (SAGARPA, 2011).

2.2. Tratamientos de conservación de la leche

2.2.1. Procesos térmicos

Principalmente los tratamientos térmicos son empleados en la conservación de la leche y de muchos alimentos más, con la finalidad de eliminar o minimizar los agentes causantes de su deterioro, alargando su vida útil y añadirle a la vez un valor agregado (Ministerio de Agricultura, 2009). La pasteurización es uno de los tratamientos térmicos más empleados para procesar la leche (Mermelstein, 2001) y ha sido definida como un proceso o tratamiento que combina las variables de tiempo y temperatura para hacer efectiva la destrucción de *Mycobacterium tuberculosis*, reduciendo a la vez el (los) microorganismo (s) más resistentes a un nivel que no presenten un riesgo para la salud pública en condiciones normales de distribución y almacenamiento. Los indicadores de un adecuado tratamiento térmico en la leche son la inactivación de la enzima fosfatasa alcalina y la inhibición del microorganismo *Coxiella burnetii* (NACMCF, 2006).

Algunas denominaciones de condiciones de procesamiento de leche son las siguientes:

LTLT (Low Temperature Low Time): Aplicación de temperaturas de 63°C por 30 min.

HTST (High Temperature Short Time): Se aplican temperaturas de 73°C durante 15 s.

UHT (Ultra High Temperature): Proceso que consiste en aplicar temperaturas de 135-140°C durante 2-4 s.

Se ha demostrado que la pasteurización provoca alteraciones en la composición nutrimental, sensorial y hasta en las propiedades tecnológicas de la leche, pues las vitaminas B₆, B₁₂ y C son susceptibles al calor perdiéndose durante el proceso así como las vitaminas liposolubles A y D principalmente, se reducen en un 50 % o hay pérdida total de éstas. Las temperaturas empleadas en determinados procesos de pasteurización tal como el tratamiento UHT induce a que se genere la reacción de Maillard formado complejos de lactulosa-lisina que son los responsables de alterar el color y sabor de la leche (Vargas, 2006).

Debido a que las centrales productoras de leche y pequeños productores, no pueden pasteurizar todo el producto inmediatamente, aplican un proceso llamado termización a temperaturas de 63-65°C durante 15-30 s para reducir momentáneamente la carga microbiana y prolongar la vida útil de la leche hasta que sea sometida a pasteurización. La termización puede inducir el crecimiento de *L. monocytogenes* que se desarrolla a las temperaturas de operación ya que éstas no la inactivan (Gervilla *et al.*, 2001), éste proceso es crítico, pues también induce a la germinación de las esporas, por lo que la leche cuando sea sometida a pasteurización ésta debe aplicar los tiempos y temperaturas establecidas para lograr la inactivación de los patógenos y esporas desarrolladas en la leche durante la termización, de lo contrario, la leche estará mal pasteurizada y esto implica un riesgo para la salud de los consumidores.

Las industrias procesadoras están obligadas a fortificar o adicionar con vitaminas o cualquier otro nutriente a los alimentos que las han perdido por causa del proceso, incluso esto se presta para usar aditivos químicos con la finalidad de mejorar el sabor, color o textura perdidos en el producto durante su proceso, por lo que éstos alimentos ya no conservan su esencia de “naturales” como los consumidores esperarían, pues la demanda de productos frescos es mayor, y el rechazo de alimentos que contienen sustancias químicas también lo es.

Procesos térmicos novedosos que no dañan severamente la calidad nutrimental y sensorial de la leche y de otros alimentos se han desarrollado, tal es el caso del calentamiento óhmico y del microondas. El primero también llamado Ohmnización, se basa en el paso de corriente eléctrica a través de los alimentos,

los cuales ofrecen una resistencia a su paso, produciendo un incremento de temperatura, así los alimentos se calientan hasta lograr el efecto térmico esperado. Esta tecnología está limitada para aplicarse sólo a alimentos líquidos muy viscosos o con partículas sólidas en suspensión (Gervilla, 2001).

En el tratamiento por microondas se usa la emisión de energía en niveles de frecuencia comprendidos entre 300 MHz y 300 GHz que provocan la fricción de las moléculas por los cambios alternos en la orientación de las mismas, lo que induce a un aumento de la temperatura del alimento que conduce a la destrucción microbiana (Villamiel, 2006).

2.2.2. Tratamientos no térmicos

Forman parte de las tecnologías desarrolladas para la conservación y/o transformación de alimentos o componentes alimenticios, su principal finalidad es obtener productos seguros con calidad organoléptica, nutricional y microbiana aceptables, éstos métodos pretenden ser equivalentes y desplazar en un futuro a los tratamientos térmicos (Asociación Española de Dietistas, 2010).

Algunos de los tratamientos no térmicos empleados para conservar los alimentos son la irradiación que implica aplicar dosis de 1 kGy hasta 10 kGy para inactivar a microorganismos patógenos, retardar procesos biológicos (senescencia y maduración) y mejorar las propiedades tecnológicas de los alimentos (Herrero y Ávila, 2006). También el ultrasonido es empleado en forma de ondas acústicas inaudibles de una frecuencia superior a 20 kHz para la conservación de los alimentos, se emplean ondas con baja frecuencia de 18-100 kHz con una longitud de onda de 145 mm y de alta frecuencia de 100-1,000 W/cm² (Llull *et al.*, 2002). Pulsos eléctricos de alta intensidad son aplicados en forma de pulsos cortos con duración de 1-10 ms cuya intensidad varía de 20-80 kV/cm con una capacitancia de 80 nF a 9.6 mF destruyendo la pared celular de los microorganismos alterando el potencial interno de la membrana, este método se ha usado como un tratamiento alternativo a la pasteurización, su uso está limitado a productos fluidos, capaces de conducir la electricidad y exentos de microorganismos esporulados (Fernández *et al.*, 2005; Palmieri, 2005). Mientras tanto los campos magnéticos oscilantes requieren envasar el alimento en un material plástico, el producto es

sometido a un campo magnético de una intensidad de entre 5-50 teslas y una frecuencia que puede variar entre 5-500 kHz durante 25 s a 10 ms causa la ruptura de la molécula de ADN y disgregación de proteínas. Sólo alimentos como jugos, frutos tropicales en soluciones azucaradas, derivados cárnicos, envasados y listos para el consumo son procesados por éste método (Bolado *et al.*, 2000).

2.3. Altas presiones hidrostáticas

La presión (p) es una magnitud física escalar que mide la fuerza (F) aplicada sobre una superficie (A). En el sistema internacional de unidades (SI) la presión se mide en pascales (Pa) que es equivalente a la fuerza total de un Newton actuando de manera uniforme sobre un metro cuadrado ($P=F/A$) (Arago *et al.*, 2007). La presión hidrostática es la presión ejercida por un fluido de manera perpendicular sobre el fondo del recipiente que lo contiene y sobre la superficie de cualquier objeto sumergido en él generado por el fluido en reposo (Douglas, 2004).

Dos principios rigen a la alta presión hidrostática, el primero es el principio isostático que consiste en aplicar una determinada presión a un material de manera homogénea e instantánea, evitando tener áreas sobre tratadas así como la deformación del producto. El segundo principio es conocido como de Le Chatelier el cual establece que un aumento de la presión aplicada a un sistema con temperatura constante, induce un desplazamiento del equilibrio en el sentido de la reacción que produce una disminución de volumen (Daoudi, 2004; Patterson *et al.*, 2005).

El uso de la presión como variable física cambia el volumen del sistema, a diferencia de la temperatura que modifica tanto la energía interna como el volumen del sistema. El principio de Le Chatelier permite predecir las modificaciones inducidas por la presión sobre las moléculas, si se conoce el cambio de volumen del proceso, se puede estimar si éste se favorece o no por la presión (Trespacios, 2007). La alta presión hidrostática (APH) se aplica en magnitudes a los alimentos de 100-1000 MPa de forma continua, durante un determinado lapso de tiempo (Herrero y Ávila, 2006). Esta tecnología emplea agua como fluido transmisor de la presión, debido a su baja compresibilidad, de ahí que se le

denomine tratamiento a altas presiones hidrostáticas (Aciara *et al.*, 2001). En la industria de alimentos se emplean tratamientos de 5 a 20 min y las presiones aplicadas no suelen ser menores a 400 MPa pero tampoco superan los 900 MPa (Téllez *et al.*, 2001). Las temperaturas de operación dependen del tipo de sistema, pero el intervalo varía generalmente entre -20°C y 80°C (San Martín *et al.*, 2002). La compresión puede incrementar la temperatura de los alimentos hasta 3°C por cada 100 MPa (Patazca *et al.*, 2007).

2.3.1. Sistemas y Métodos de presurización

Se conocen 3 tipos de sistemas o procesos que emplean altas presiones con o sin variación de temperatura, en la industria se usará uno u otro en función del uso al que se destinen. El primer sistema de presurización es conocido como presión isostática en frío (PIF), que consiste en colocar en moldes de elastómero a los materiales en polvo que posteriormente se someten a APH. Las presiones aplicadas oscilan entre 50-600 MPa a temperatura ambiente, el tiempo del tratamiento puede variar de 1 a 30 min y el volumen de la vasija, cilindro o cámara de presurización puede tener la capacidad desde algunos cm³ hasta 1 m³. Esta técnica fue empleada inicialmente en la industria cerámica, metalúrgica y del carbón. El medio presurizante es agua mezclada con una pequeña cantidad de aceite como anticorrosivo y lubricante (Herrero y Ávila, 2006). Otro sistema es la presión isostática templada (PIT), la cual emplea temperaturas que van desde 20°C y 200°C donde el agente presurizante empleado es el agua. El tercer sistema es llamado presión isostática caliente (PIC), utiliza temperaturas de 2000°C y el medio presurizante es un gas, no es muy utilizado. En la industria de alimentos se utilizan básicamente los procesos de presurización en frío (Téllez *et al.*, 2001; Yuste *et al.*, 2001; Smelt *et al.*, 2002).

La alta presión puede generarse por tres formas distintas: compresión directa, compresión indirecta y calentamiento del medio presurizante, conocidos como métodos de presurización.

La compresión directa requiere de un pistón, donde la alta presión se produce por medio de la presurización del medio a través del extremo del pistón de diámetro pequeño; éste método permite compresiones muy rápidas (Saldo *et*

al., 2009; Tonello, 2010). En el método de compresión indirecta se usa un intensificador de alta presión para bombear el medio presurizante desde un depósito hacia la cámara de presurización, alcanzando de esta forma la presión deseada, dicho método es el que tiene mayor aplicación a escala industrial. El tercer método se basa en la propiedad del medio presurizante, cuando se le aplica una elevada temperatura obteniendo una alta presión, para esto se requiere tener un control muy preciso de la temperatura dentro del volumen interno total de la cámara de presurización (Bolado *et al.*, 2000).

2.3.2. Equipos de alta presión hidrostática

El tratamiento a alta presión puede aplicarse en dos tipos de equipos dependiendo del tipo de producto a tratar, teniendo así el equipo discontinuo que se utiliza para presurizar productos líquidos o sólidos ya envasados, que consiste de un cilindro de acero inoxidable de pared gruesa y resistente que contiene en su interior el medio de compresión (agua o una mezcla de agua y aceite), el cual es impulsado desde un depósito hasta el recipiente de tratamiento, Figura 1.

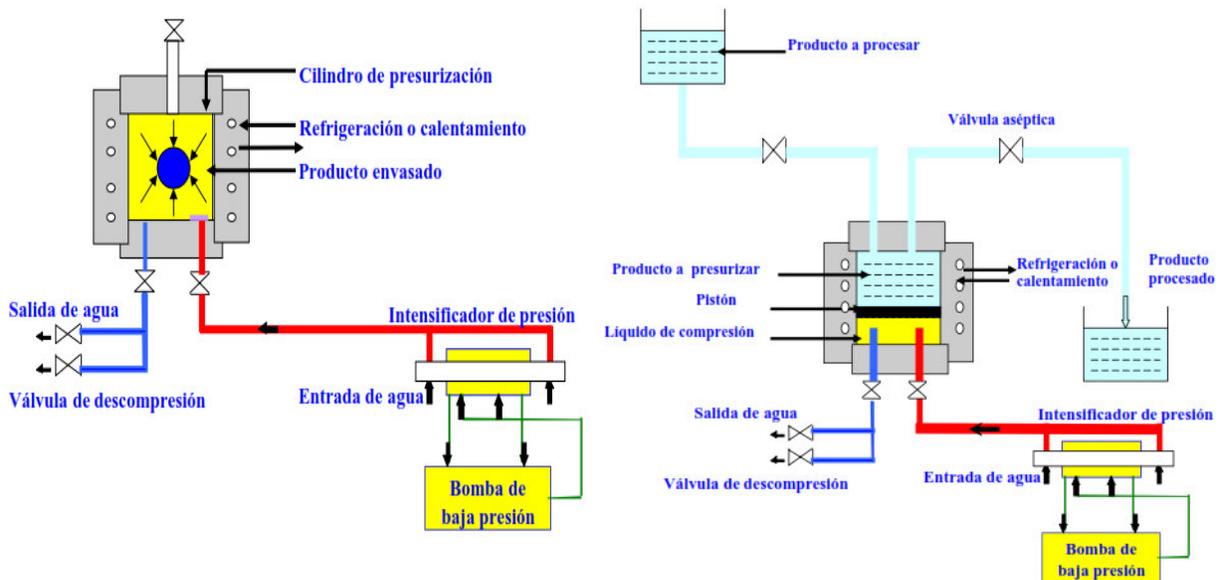


Figura 1. Equipos de alta presión hidrostática. A la izquierda se muestra un equipo de APH discontinuo y la derecha un equipo de APH semicontinuo (Daoudi, 2004).

Los equipos tipo semicontinuos son utilizados para alimentos líquidos no envasados, que se pueden bombear fácilmente. El tipo de compresión generada es directa, lo que conduce a que el alimento esté en contacto directo con el acero de la cámara, por lo que este debe de ser de un material que no experimente corrosión durante el proceso y que sea el permitido para tratar los alimentos. Una bomba presuriza el agua, que se encuentra separada del alimento por el pistón, el producto una vez presurizado sale de la cámara por medio de una válvula aséptica de alta presión, éste tipo de equipo tiene mejor rendimiento volumétrico y mejor aprovechamiento de la energía eléctrica utilizada, Figura1 (Daoudi, 2004).

El futuro de la tecnología de las altas presiones hidrostáticas depende en gran medida de los fabricantes de los equipos para solucionar una gran cantidad de retos tecnológicos y así obtener equipos con bajo coste de operación, de alta fiabilidad y con nuevas capacidades tecnológicas, en este sentido el futuro es prometedor pues la nueva generación de equipos permitirán procesos eficientes (Velázquez *et al.*, 2005).

El costo estimado de un tratamiento de 500 MPa es de \$ 2.9 MXN/kg de producto (Saldo *et al.*, 2002), en México el costo comercial del kilowatt-hora (kWh) tiene un precio de \$1.496 (CFE, 2012), el gasto energético del equipo de APH depende de su capacidad, país donde se establece y duración del tratamiento de presurización, por lo cual se recomiendan tiempos menores de 15 min para tener procesos eficientes donde el consumo energético sea mínimo (Reventos, 2003).

2.4. Aplicaciones de la APH en alimentos

Dentro de las innovaciones tecnológicas para la conservación de alimentos ha surgido la alta presión hidrostática (APH) por medio de la cual se pueden presurizar alimentos líquidos, sólidos y viscosos (Yuste *et al.*, 2001). De esta forma los primeros alimentos procesados por APH fueron mermeladas de fresa, kiwi y manzana los cuales se comercializaron por la firma japonesa Mieidi-Ya Food Co en el año de 1990. En Europa se procesan y comercializan productos presurizados como jugos de naranja y manzana, salsas tipo guacamole, ostras, pescados, carnes, entre otros. La leche ha sido un producto presurizado en el

Reino Unido y comercializado, puesto que se ha demostrado que conserva sus propiedades nutritivas, sabor y aroma casi idénticos al natural haciendo que el consumidor tenga preferencia por éste tipo de producto (Cano *et al.*, 2005). La leche pasteurizada es uno de los dos primeros alimentos más consumidos en el mundo, sin embargo su corta vida de anaquel ha sido un obstáculo para su comercialización en diversas regiones, la APH es una alternativa al proceso de pasteurización de la leche para prolongar su vida útil por medio de la reducción microbiana y estabilidad en su calidad sensorial (Hernández *et al.*, 2005). Se ha encontrado que la APH es eficaz para retardar la acidez de la leche reduciendo la población inicial de microorganismos con una eficacia similar a la pasteurización (73°C/15 s) (Buffa *et al.*, 2001). Ésta tecnología no térmica será incorporada en poco tiempo para proveer de raciones de alimentos a los militares, pues se han demostrado resultados positivos en la elaboración de productos lácteos, frutas, hortalizas, papas, huevos, pescados y carnes (Barbosa *et al.*, 2010). El puré de papa tratado bajo el proceso térmico combinado con las altas presiones ha sido oficialmente aceptado como alimento de uso militar (Chen y Perchonok, 2008).

Varias investigaciones han demostrado que la aplicación de APH en leche para la elaboración de yogurt incrementa la elasticidad de los geles obtenidos, en comparación con los elaborados por leche pasteurizada, además de reducir considerablemente la sinéresis de estos geles ácidos (Gervilla, 2001), lo que implica que se pueden mejorar las propiedades tecnológicas de los alimentos al ser presurizados.

A finales del año 2009 los porcentajes de comercialización de productos presurizados eran de 36 % para productos vegetales, 31 % productos cárnicos, 14 % de pescado y productos de la pesca, 12 % de jugos y bebidas, 7 % de otros, por lo cual la tendencia irá en aumento en la producción de alimentos presurizados (Tonello, 2010).

2.4.1. Efecto de la APH en los constituyentes de los alimentos

La APH ha demostrado tener un efecto insignificante sobre el contenido de nutrientes de los alimentos, esto puede deberse a que los enlaces covalentes de las moléculas de los alimentos no se afectan por el aumento de la presión, por

lo menos hasta valores de 1.0-1.5 MPa de tal modo que se ha establecido que los puentes de hidrógeno se estabilizan por la alta presión, cuando un ión se forma en solución, los dipolos del agua cercanos se comprimen fuertemente por el campo eléctrico, fenómeno conocido como electrostricción, que se acompaña por una disminución de volumen. Las interacciones electrostáticas de las moléculas son mucho más débiles a presiones elevadas, generalmente se acepta que en la formación de atracciones hidrofóbicas hay cambios de volumen que se ven desfavorecidos por la presión, sin embargo, muchas interacciones entre anillos aromáticos se estabilizan (Trespacios, 2007).

En la mayoría de los casos la alta presión mejora la calidad organoléptica de los productos, tal es el caso del jugo de pomelo que al ser presurizado no tiene el sabor amargo que obtiene al ser tratado térmicamente. Los jugos de frutos cítricos al ser sometidos a alta presión adquieren un sabor fresco, sin pérdida de vitamina C y con una vida útil de 17 meses. Los duraznos tratados por APH permanecen estériles por 5 años; las peras adquieren una textura más blanda, se hacen más dulces, los colores y sabores no son afectados por la presurización (Téllez *et al.*, 2001). Por otro lado el ácido ascórbico evaluado bajo diferentes combinaciones de presión, tiempo y temperatura se mantiene en valores cercanos a los previos al tratamiento; a presión constante la degradación es sensible al aumento de la temperatura. En general, para conservar la vitamina C es mejor emplear altas presiones durante el menor tiempo posible (Houska *et al.*, 2005). El jugo de naranja presurizado y almacenado a 4°C durante 4 días contiene mayor cantidad de carotenos que un jugo no tratado, hecho que se atribuye por destrucción de enzimas causantes de la degradación de los carotenos durante la conservación (Sánchez *et al.*, 2009). Se ha evaluado que la APH mantiene la capacidad antioxidante, aunque depende de los parámetros del proceso, de la matriz alimentaria estudiada así como del método de análisis usado. Un alimento presurizado conserva por más tiempo su capacidad antioxidante durante el almacenamiento en refrigeración que un alimento tratado térmicamente (Saldo *et al.*, 2009).

2.4.2. Efecto de la alta presión en los componentes de la leche

La APH afecta mínimamente a los componentes de la leche, esto es importante porque aparte de conservar sus nutrientes, también puede ser empleada para la elaboración de productos como yogurt, mantequilla y quesos (Bertelli *et al.*, 2008).

El efecto de la presión sobre el agua como componente de la leche está vinculado con el descenso del punto de congelación, lo que implica a establecer nuevos criterios en leche presurizada para prevenir prácticas fraudulentas (Huppertz *et al.*, 2006, Bermúdez *et al.*, 2008). El agua experimenta reducciones de 3.7, 6.7 y 11.1 % de su volumen a las presiones de 100, 200 y 400 MPa respectivamente a temperatura ambiente, además se producen cambios en el pH (a 100 MPa y 25°C el $\Delta\text{pH}=-0.73$), aunque este fenómeno es reversible a presión atmosférica, estos cambios de pH podrían ser suficientes para provocar modificaciones que conducen a cambios importantes como desnaturalización proteica, inactivación microbiana etc. La compresión adiabática produce un incremento moderado de la temperatura (2-3°C por cada 100 MPa), que a su vez depende de la temperatura inicial y de la velocidad de compresión del agua (Gervilla, 2001). La APH no causa ninguna alteración cualitativa ni cuantitativa sobre el contenido de lactosa a presiones de 100-400 MPa durante 10-60 min esto es importante puesto que la leche presurizada puede ser usada en la elaboración de yogurt y bebidas lácteas fermentadas (Bertelli *et al.*, 2008). Sin embargo, la APH provoca la disociación de las proteínas oligoméricas y de los complejos proteicos; una elevada presión tiende a ocasionar que las proteínas adopten una estructura más compacta, aunque la pérdida de su estructura secundaria y primaria es un fenómeno que solamente se presenta a presiones superiores a los 600 MPa (Asociación Española de Dietistas, 2010). La APH depende de factores extrínsecos para alterar la estructura de las proteínas, entre los que destacan, pH, temperatura y fuerza iónica, también va a depender de las propiedades intrínsecas de la proteína, como el número de puentes disulfuro que la forman pues son los responsables de la estabilidad y flexibilidad molecular (Bouaouina *et al.*, 2006). El desdoblamiento de la estructura de la proteína se debe a las interacciones

hidrofóbicas y electrostáticas, ya que los puentes de hidrógeno y enlaces covalentes de la proteína no se ven afectados por las altas presiones (Needs *et al.*, 2000 y Bouaouina *et al.*, 2006). Las micelas de caseína se rompen por la APH en un amplio intervalo de pH, de modo que se transfieren grandes cantidades de caseína a la fase sérica (Anema, 2010). Presiones de 150 MPa disminuyen el tamaño de las micelas de caseína (Needs, 2000; Dalgleish *et al.*, 2005), por lo que la alteración de las micelas puede ser ocasionada por la solubilización del fosfato de calcio coloidal por efecto de la alta presión, ocasionando que se establezcan interacciones electrostáticas intermoleculares muy fuertes (Huppertz *et al.*, 2006). La α -lactoalbúmina es menos sensible que la β -lactoglobulina la cual se desnaturaliza a presiones por encima de 100 MPa, la α -lactoalbúmina es más estable puesto que su estructura molecular es más rígida debido a los cuatro grupos disulfuro que posee (Huppertz *et al.*, 2002). Por otro lado el efecto de la APH en la actividad enzimática, puede ser tanto de incremento como de disminución (hasta llegar a inactivarse) dependiendo de la enzima, la naturaleza de los sustratos y parámetros del proceso, tiempo, temperatura y presión (Bendicho *et al.*, 2002). La mayoría de las enzimas presentes en la leche son barorresistentes como la fosfohexoisomerasa, lipasa y δ -glutamilttransferasa, excepto la fosfatasa que tiene su actividad significativamente reducida a presiones mayores de 200 MPa (Balci *et al.*, 2002; Rademacher *et al.*, 2006). La lactoperoxidasa tratada en leche bovina a presiones de 700 MPa a 20-65°C durante 140 min logra mantener su actividad haciéndose resistente a esas condiciones. La fosfatasa alcalina logra inactivarse a presiones superiores a 300 MPa con tan solo 5 min en leche de bovino (Ludikhuyse *et al.*, 2001).

La materia grasa de leche de vaca está en forma de glóbulos grasos, los cuales tienen una composición de alrededor del 98 % de triglicéridos, tienen un diámetro entre 0.1 y 15 μm (Huppertz *et al.*, 2002). La materia grasa es importante pues provee buenas características de textura, retención de agua en los geles así como de contribuir en el sabor de derivados lácteos como el queso, mantequilla y leche (Gervilla, 2001). Con presiones de 100-250 MPa los glóbulos de grasa aumentan su tamaño, además hay una agregación de inmunoglobulinas y

lipoproteínas (Bertelli *et al.*, 2008). Presiones mayores a 400-600 MPa no influyen significativamente en el tamaño de los glóbulos de grasa, mientras que a presiones de 50-500 MPa hay un cambio en la fase lipídica de la leche observando un aumento en la velocidad de cristalización (Bendicho *et al.*, 2002).

2.4.3. Efecto de la APH en los microorganismos

La inactivación de microorganismos por APH se debe a diversos mecanismos y depende de varios factores, entre los que se encuentran tiempo y temperatura de exposición, magnitud de la presión, composición del alimento, tipo de bacterias, fase de crecimiento celular, pH del medio, además de la relación que existe entre los cambios de presión y volumen (Bozoglu *et al.*, 2004; Erkmén, 2009). Se ha observado que entre más compleja sea la estructura del microorganismo más sensible es a la presurización, de modo que las células eucariotas son más sensibles que las procariontas. Los hongos y las levaduras presentan mayor sensibilidad que las formas vegetativas bacterianas, esto a presiones de 200-300 MPa, las células vegetativas pueden inactivarse a magnitudes de 400-600 MPa, en cuanto a las esporas pueden resistir presiones de 1000 MPa (Bertelli *et al.*, 2008). Algunos mecanismos propuestos de lo que induce a la muerte bacteriana por efecto de la alta presión, mencionan que se daña primeramente la pared celular, posteriormente la membrana, la cual pierde su permeabilidad ya que se forman poros y hay pérdida compuestos intracelulares ocasionando un desequilibrio osmótico, también hay desnaturalización de enzimas responsables del metabolismo bacteriano, alteración de mecanismos genéticos y de la morfología (FDA, 2000), también se induce a la cristalización de los fosfolípidos de membrana (Mañas y Pagán, 2005; Rivalain *et al.*, 2010). Cuando se aplica la presión varios sitios de la célula bacteriana pueden dañarse y la ATPasa de la membrana ya no puede realizar su función debido a la desnaturalización directa o por dislocación de la membrana, causando que el ATP ya no se hidrolice y por lo tanto ya no está disponible para llevar a cabo el transporte activo de protones, que conduce a que el pH celular disminuye acidificando el interior de la célula por lo que ésta tiende a morir. Las bacterias en

fase estacionaria son más resistentes a la APH que las células en fase exponencial (Pagan y Mackey, 2008).

Aquellos microorganismos que pueden crecer a presiones de 40-50 MPa se les llama barófilos, los que son incapaces de crecer a 30-40 MPa se les conoce como barófilos y a los que crecen en el intervalo de 1-50 MPa son euribáricos. Las células bacterianas que sobreviven pero no crecen a presiones de 50-200 MPa se les denomina barodúricos (Téllez *et al.*, 2001). Las bacterias Gram-positivas son más resistentes a la alta presión que las Gram-negativas por que las primeras poseen en su pared celular una capa gruesa de peptidoglucano que les confiere mayor protección, en cambio las segundas tienen una capa delgada de éste compuesto que las hace mucho más sensibles.

Las principales bacterias patógenas encontradas en la leche cruda de vaca son *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella ssp.*, *E. coli.*, *Listeria spp.*, las cuales pueden inactivarse por altas presiones (Deet *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que *Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis* (Map) se reduce hasta 4 Log de células viables con 500 MPa por 10min (Patterson y Donaghy, 2007). Mientras que un brote se origina con > 2 Log de éstas células viables. Algunas evidencias de la aplicación de APH en la inactivación microbiana demuestra que *L. monocytogenes* puede ser inactivada en rangos de temperatura de 40-50°C a presiones de 400-500 MPa por 10-15 min (Chen y Hoover, 2002). Sin embargo, se pueden emplear presiones de hasta 600 MPa con tiempos inferiores a 15 min a temperatura ambiente. Por otro lado *Salmonella typhimurium* a 400 MPa por 10 min de exposición a 45°C con un pH de 5.0 se inactiva (Erkmen, 2009). El efecto del pH es importante para mantener la célula dañada y que no pueda revertir su lesión (Bozoglu *et al.*, 2004). Para lograr una reducción de hasta 6 Log UFC/ml de *S. aureus* en leche UHT entera se requiere de 300 MPa, 15 min y 34°C (Huppertz *et al.*, 2006). *Yersinia enterocolitica* se reduce 8 Log UFC/ml a 350 MPa durante 24 min a temperatura ambiente (Chen y Hoover, 2003), mientras que a la misma temperatura *E. coli* se reduce 4 Log UFC/ml a 241 MPa por 5 min (Beltrán *et al.*, 2011). Todas estas evidencias dan pauta para aplicar el proceso de

altas presiones en alimentos y lograr obtener productos inocuos, nutritivos y seguros para el consumidor.

2.5. Legislación de la aplicación de alta presión hidrostática en alimentos

Agencias reguladoras como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) han aprobado el uso de APH, primero como una alternativa a la pasteurización y recientemente en Febrero de 2009, en combinación con el calor, como una alternativa para la esterilización de alimentos conocidos como “Esterilización térmica Asistida por Presión (PATS, por sus siglas en inglés), (NACMCF, 2006). Con la reciente aprobación del proceso PATP como tecnología de esterilización, se abren nuevas fronteras para la elaboración y desarrollo de nuevos alimentos incluyendo aquellos que son destinados para los astronautas (Barbosa *et al.*, 2010). En Estados Unidos la reglamentación para el desarrollo de nuevos productos es más favorable, pues la FDA autoriza la comercialización pero declina toda responsabilidad por lo que el industrial es el único garante. Por otro lado la Seguridad Alimentaria y Servicio de Inspección (FSIS, por sus siglas en inglés) exige simplemente que el tratamiento por APH sea capaz de destruir a *L. monocytogenes* en productos listos para el consumo que sean derivados de carnes de bovinos, porcinos y aves (Cheftel *et al.*, 2002).

2.6. Los modelos matemáticos y sus aplicaciones en la inactivación microbiana por altas presiones hidrostáticas

En las últimas décadas los ingenieros y científicos de los alimentos han descrito la inactivación térmica de bacterias siguiendo una cinética de primer orden y se han utilizado parámetros como valores D, Z y F_0 para el cálculo de la letalidad del proceso, sin embargo, se ha demostrado que raramente las bacterias siguen dicho comportamiento durante la inactivación y por lo tanto se han cuestionado los modelos matemáticos de cálculo utilizados por la industria (Corradini *et al.*, 2005).

Los modelos matemáticos son una herramienta empleada para poder describir el tipo de inactivación bacteriana por efecto de un tratamiento que puede ser térmico o no. Ha surgido la necesidad de desarrollar modelos matemáticos que además de describir la inactivación también logren predecir el comportamiento de la población microbiana bajo diferentes condiciones ambientales para generar tecnologías que aseguren la inocuidad de los alimentos. El modelamiento tiene como objetivo cuestionar y examinar los conceptos dogmáticos que han dominado el campo de la microbiología cuantitativa por muchos años (Peleg, 2006).

2.6.1. Modelos no lineales

2.6.1.1. Modelo de Weibull

Este modelo asume que las células de una población tienen diferente resistencia al ser inactivadas. El modelo de Weibull se muestra en la Ec. 1.

$$\log \frac{N}{N_0} = -bt^n \quad (1)$$

donde b es un parámetro no lineal que refleja la pendiente y n indica la concavidad de la curva. En una distribución de Weibull si la curva de sobrevivencia es cóncava hacia arriba se tiene que $n < 1$. Sí la curva de sobrevivencia es cóncava hacia abajo es $n > 1$ y si la curva es lineal $n = 1$ (Buzrul *et al.*, 2008).

2.6.1.2. Modelo de Gompertz

La ecuación modificada de Gompertz fue originalmente propuesta por Gibson *et al.* (1988), se describe en la Ec. 2.

$$\log \frac{N}{N_0} = Ce - e^{BM} - Ce - e^{-B(t-M)} \quad (2)$$

donde t es el tiempo (min) de procesamiento, M es el tiempo al cual se obtiene la máxima muerte microbiana, B es la tasa de muerte relativa a M, C es la diferencia del valor de las asíntotas superior e inferior (Chen *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a los brotes de listeriosis generados por el consumo de leche cruda o mal pasteurizada, así como sus derivados, y a que existe una tendencia del consumidor a adquirir productos lácteos de una calidad sensorial aceptable sin conservadores o aditivos químicos, la tecnología de altas presiones hidrostáticas puede ser una alternativa para procesar leche cruda de vaca, ya que tiene la capacidad de inactivar microorganismos patógenos y deterioradores sin alterar las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos. En este trabajo se pretende obtener una leche presurizada que sea segura para su consumo y su uso para elaboración de productos lácteos, como un elemento para prevenir brotes de listeriosis.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el tratamiento de altas presiones hidrostáticas en leche cruda de vaca y determinar la condición en la que puede ser un método equivalente a la pasteurización.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Mediante la evaluación del efecto de las variables tiempo y presión sobre la inactivación microbiana, determinar cuáles son las condiciones de proceso a APH equivalentes a la pasteurización.
- Determinar la calidad microbiológica de la leche presurizada en cada condición evaluada según lo establecido por las normas oficiales mexicanas.
- Evaluar el efecto del tratamiento de alta presión hidrostática equivalente a la pasteurización sobre la viabilidad de *Listeria innocua* como un subrogado de *L. monocytogenes*.
- Evaluar la estabilidad de la leche procesada con el tratamiento equivalente a la pasteurización, durante 10 días de almacenamiento a 4°C.
- Realizar cinéticas de inactivación de *L. innocua* en leche UHT entera a diferentes presiones y tiempos, evaluándolas por medio de modelos no lineales para explicar su comportamiento.

5. METODOLOGÍA

5.1. Análisis microbiológicos

5.1.1. Determinación de microorganismos indicadores

Las determinaciones microbiológicas se realizan siempre bajo condiciones estériles, usando una campana de flujo laminar.

Los microorganismos indicadores se determinan en leche cruda, leche presurizada y leche pasteurizada empleadas en este trabajo.

La determinación de coliformes totales se realiza mediante la metodología de la (NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de coliformes totales en placa). Se realizan diluciones decimales, iniciando por la dilución primaria, para la cual se usan 25 ml de muestra que se colocan en 225 ml de agua peptonada estéril al 0.1 % (p/v) la cual se vierte previamente en una bolsa estéril Whirl-pak y se agita manualmente por 7 s para homogeneizar, luego se toma 1 ml y se coloca en un tubo de vidrio que contiene 9 ml de agua peptonada estéril al 0.1 % (p/v) se cierra el tubo con un tapón de rosca y se agita con un vórtex por 7 s, de ese tubo se toma 1 ml y se vierte en otro tubo que contiene 9 ml de agua peptonada estéril 0.1 % (p/v), se cierra el tubo y agita en vórtex nuevamente por 7 s y así sucesivamente se realizan las diluciones decimales necesarias. Para la leche cruda se realizaron 7 diluciones sembrando las últimas cuatro y para la leche presurizada se realizaron 4 diluciones sembrando todas, y cada una por triplicado. Para sembrar se toma 1 ml de cada dilución y se coloca en una caja petri estéril y luego se le agregan 15-20 ml de agar rojo violeta bilis lactosa (Bioxon, Becton Dickinson, México) el cual debe tener una temperatura de 45°C aproximadamente, a este medio previamente se le ajusta el pH a 7.4 con HCl 0.1 N ó NaOH 0.1 N a 25°C; el inóculo con el medio se mezclan realizando seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido del reloj y otros seis movimientos en el sentido contrario, se deja que las cajas Petri se solidifiquen y se invierten con la tapa hacia abajo para luego ser incubadas a 35°C por 24±2 h. Las colonias típicas presentan un color rojo oscuro y generalmente presentan un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro a rosa, las colonias tienen

un halo de 0.5-2 mm. Para el conteo de las colonias se utilizó cuenta colonias, el número de coliformes se calcula multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución, se reportan UFC/ml ó en Log UFC/ml.

La determinación de bacterias mesófilas aerobias (BMA) se realiza siguiendo la metodología establecida por la (NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa). Implica el mismo procedimiento para realizar las diluciones decimales en agua peptonada estéril al 0.1 % (p/v) y la misma técnica de vaciado en placa empleado para la determinación de coliformes, solo que el medio de cultivo a usar es cuenta total estándar (Bioxon, Becton, Dickinson, México), las placas se incuban a 35°C por 48±2 h. Se usa un contador de colonias y el cálculo se realiza multiplicando el número total de colonias en la placa por el inverso de la dilución. Los resultados se expresan en UFC/ml ó en Log UFC/ml.

5.1.2. Determinación de microorganismos patógenos

Las determinaciones microbiológicas se realizan en condiciones estériles, usando una campana de flujo laminar.

Para la determinación de *S. aureus* se empleó la metodología de la (NOM-115-SSA1-1994. Método para la determinación de *S. aureus* en alimentos) que consiste en realizar diluciones decimales en agua peptonada al 0.1 % (p/v) cuyo procedimiento es el mismo que se menciona para determinación de indicadores. En el caso de la leche cruda se realizaron 7 diluciones sembrando las últimas 4, mientras que para la leche presurizada se realizaron 4 sembrándolas todas, la siembra se realizó por triplicado para cada dilución, tomando de cada una por medio de una micropipeta con punta estéril una alícuota de 100 µl ó 0.1 ml la cual es colocada en una caja petri que contiene el medio Baird-Parker (Becton, Dickinson, México) estéril y ya solidificado, se extiende el inóculo con una varilla de vidrio estéril en forma de ángulo recto, se usa una varilla para cada dilución a sembrar, se espera durante 10 min para que la muestra sea absorbida por el medio, luego la placa se invierte (con la tapa hacia abajo) y se incuba a 35°C por 48 h. Las colonias típicas de *S. aureus* son de color negro, pequeñas, circulares, convexas, lisas y de diámetro de 1-2 mm y presentan un halo transparente

alrededor de la colonia. Se seleccionaron de 3-5 colonias por placa para realizar la prueba de catalasa, la cual consiste en colocar la colonia típica en un portaobjetos y se le agrega una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % la formación de efervescencia indica prueba positiva para *S. aureus*. El cálculo del número de microorganismos se realiza tomando en cuenta el número de colonias totales por el número de colonias que fueron positivas a la prueba entre el número de colonias que seleccionaron para la confirmación y el resultado se multiplica por el factor de la dilución y por 10. El resultado se expresa en UFC/ml o en Log UFC/ml.

Salmonella. Se emplea la (NOM-114-SSA1-1194. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos) la determinación se realiza comenzando por un pre-enriquecimiento que consiste en colocar 25 ml de muestra en 225 ml de caldo lactosado estéril el cual previamente está contenido en una bolsa estéril Whirl-pak, se agita manualmente por 7 s y se incuba a 35°C por 24 h; posteriormente se realiza la segunda etapa que corresponde al enriquecimiento, tomando 1 ml del cultivo anterior que se vierte en un tubo con 10 ml de caldo tetracionato, y otro ml del mismo cultivo es tomado para ser colocado en un tubo con 10 ml de caldo selenito-cistina, se realiza cada tubo por duplicado, se agitan en vórtex por 7 s para homogeneizar y son incubados a 35°C por 24 h. Transcurrido ese tiempo se realiza la etapa de aislamiento de la *Salmonella*, donde para cada tubo de tetracionato y selenito-cistina se agitan nuevamente en vórtex por 7 s una asa estéril se introduce en cada tubo y se estría por triplicado en cada tipo de agar selectivo: agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (Bioxon, Becton Dickinson de México), agar verde brillante (Bioxon, Becton Dickinson de México) y en agar *Salmonella-Shigella* (Bioxon, Becton Dickinson de México), se incuban a 35°C por 24 h; transcurrido el tiempo de incubación se procede a la identificación de colonias típicas de *Salmonella*, las cuales presentan las siguientes características:

Colonias en agar XLD: Las colonias son rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar Verde Brillante: Colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las colonias fermentadoras de la lactosa aparecen de color amarillo.

Agar SS: Colonias translúcidas, ocasionalmente opacas, algunas colonias presentan un centro negro, mientras que las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

Se eligen dos colonias típicas de cada medio de aislamiento, y se inoculan cada una en un tubo de agar triple azúcar hierro (TSI) (Bioxon, Becton Dickinson de México) y en agar hierro lisina (LIA) (Bioxon, Becton Dickinson de México) por estría en la superficie y por punción en el fondo, cada tubo se realiza por duplicado, se incuban a 35°C por 24 h. En el caso de no tener colonias típicas, este paso ya no se realiza, de lo contrario, se observa el crecimiento en los tubos que presentan las siguientes características cuando la reacción de *Salmonella* es positiva:

Agar TSI: En el fondo del tubo se observa un vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

Agar LIA: Se observa la intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Se consideran negativos aquellos tubos que presentan coloración amarilla en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella* producen ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción. Los resultados se reportan como presencia o ausencia de la *Salmonella* en 25 ml de muestra.

Listeria monocytogenes. La NOM-143-SSA1-1995. Determinación de *L. monocytogenes* en alimentos, para evaluarse emplea para evaluar la ausencia o presencia del patógeno en las muestras a analizar. Ésta norma establece una serie de pasos, comenzando por el pre-enriquecimiento, para lo cual se usaron 25 ml de muestra que se suspenden en 225 ml de caldo de enriquecimiento para listeria LEB (Difco Becton Dickinson Company) se homogeniza agitando

manualmente por 7 s y se incubó a 48 h por 30°C. Transcurrida la incubación anterior se realiza el paso de aislamiento, de tal forma que se introduce una asa estéril dentro de la muestra y se estría por triplicado en placas de dos tipos de medios selectivos: Medio Oxford Modificado (MOX) y cloruro de litiofeniletanol-moxolactamo (LMP), luego las placas del medio LMP se incuban a 30°C por 48 h y las placas del medio MOX se incuban a 35°C durante 48 h. Se sembraron cepas de referencia en ambos medios selectivos.

Las colonias de *Listeria* en el medio LMP se observaron con luz blanca a un ángulo de 45° donde las colonias presuntivas presentan una coloración azul o blancas iridiscentes.

Las colonias típicas sembradas en las placas del medio MOX de *Listeria monocytogenes* presentan un color negro o café oscuro, convexas, de diámetro de 2-3 mm., presentan un halo negro y el centro hundido. Si existen colonias presuntivas en los dos tipos de medios se procede a realizar el paso de la purificación y aislamiento de las colonias, que consiste en tomar de 5-6 colonias típicas las cuales se siembran en placas con agar soya tripticosa con 0.6 % (p/v) de extracto de levadura (ASTEL) (Becton Dickinson, México), se incuban a 24 h por 30°C. Después del tiempo de incubación se utilizaron las colonias desarrolladas para realizar la prueba bioquímica de la catalasa para *Listeria*, la cual se realiza transfiriendo con una asa de plástico estéril cada colonia a un portaobjetos, se agrega una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v), se mezcla para homogeneizar bien toda la colonia con un asa de plástico o palillo de madera para evitar el contacto del metal con el peróxido, la formación de efervescencia indica que es prueba positiva para *Listeria monocytogenes*. El resultado se expresa como presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 ml de muestra.

5.2. Análisis fisicoquímicos

5.2.1. Determinación de acidez

La acidez se determina en leche cruda, presurizada, pasteurizada y UHT.

El método consiste en medir 20 ml de muestra y se colocan en un matraz erlenmeyer y luego se le agregan 2 ml de fenolftaleína al 1 % (p/v), se procede a titular la muestra con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente cuando menos un minuto (NOM-091-SSA1-1994).

Se usa la siguiente fórmula para el cálculo de acidez:

$$\text{acidez (g/l, ácido láctico)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

V= Volumen gastado de la solución de NaOH 0.1 N en la titulación de la muestra, en ml.

N= Normalidad de la solución de NaOH

M= Volumen de la muestra en ml

90= Equivalente de ácido láctico

1ml de NaOH 0.1 N es igual a 0.0090 g de ácido láctico

5.2.2. Medición de pH

Se colocan en un vaso de precipitado 10 ml de leche y ahí se introduce el potenciómetro debidamente calibrado, sumergiendo el electrodo en la muestra de modo que se cubra totalmente. El valor de pH se obtiene directamente de la lectura establecida por el potenciómetro (NMX-F-317-S-1978). La determinación de pH se realiza en leche pasteurizada, UHT y presurizada con la condición de equivalencia a la pasteurización.

5.2.3. Determinación de grasa por el método Gerber

Consiste en adicionar a un butirómetro limpio y seco, lentamente y por las paredes 10 ml de ácido sulfúrico, después se agregan sin mezclar 11 ml de leche, luego se coloca 1 ml de alcohol isoamílico; con un tapón de caucho se tapa perfectamente el butirómetro y se agita para incorporar perfectamente bien el contenido. La reacción que se produce es exotérmica y el butirómetro se calienta, de tal forma que la reacción concluirá cuando el contenido presente una coloración

café/morado uniforme. Después el butirómetro se coloca en la centrífuga Gerber y se somete a 11000 rpm durante 4 min., para luego leer el contenido de grasa en la leche por medio de la escala del butirómetro, expresada en porcentaje en peso de grasa (NMX-F-387-1982). La determinación de grasa se realiza solo en leche cruda de vaca.

5.2.4. Prueba Delvotest® para la detección de residuos de antibiótico en leche cruda

La prueba consiste en hacer uso de una ampolleta que contiene un medio sólido de agar sembrado del microorganismo *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*, se toma con unas pinzas una pastilla nutritiva y se le agrega a una ampolleta; con ayuda de una punta desechable que se coloca a una jeringa dosificadora se toma una alícuota de 1 ml de leche que se deposita dentro de la ampolleta, luego ésta se introduce en un baño de agua a 65°C durante 2.5 h. El resultado obtenido es cualitativo en función de la coloración presentada. Si la ampolleta muestra un color amarillo indica que la prueba es negativa, si el color fuera púrpura estará indicando que la leche contiene antibióticos, la prueba es positiva cuando el contenido de antibióticos sobre pasa el límite de detección de la prueba que es de 3 ppb si el color presentado llegara a ser entre amarillo-púrpura al menos la muestra contendrá 1 ppb de antibiótico (Delvotest® SP-NT, 2009).

5.3. Activación de la cepa de *L. innocua*

Consiste en colocar el contenido de un tubo eppendorf (2-3 chaquiras que contienen *L. innocua*) en 10 ml de caldo soya tripticasa (Bioxon, Becton Dickinson, México) previamente estéril y se incuban durante 15 h a 37°C en una incubadora con agitación orbital VWR a 185 rpm después de ese tiempo la concentración de células es de 9 Log UFC/ml.

5.4. Preparación y presurización de las muestras de leche cruda de vaca

El proceso de preparación e inoculación de muestras así como los análisis microbiológicos se realizan bajo condiciones estériles. A la leche cruda y presurizada les realizan las determinaciones microbiológicas (coliformes, bacterias mesófilas aerobias, *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*), las pruebas

fisicoquímicas (pH, acidez, grasa) y la prueba de antibiótico sólo se realizan para leche cruda, la cual fue obtenida de un establo del municipio de Apodaca, Nuevo León. Del mismo lote de leche se manejaron dos sistemas o tipos de leche para ser evaluados. El primer sistema o tipo de leche fue solamente leche cruda y el segundo fue leche cruda inoculada con 7 Log UFC/ml de *L. innocua* que representa 1.2 ml del inóculo previamente activado en caldo soya tripticasa.

Ambos sistemas se someten a las mismas condiciones de presurización, se utilizan 2 muestras para cada condición a evaluar de cada tipo de leche o sistema, el volumen de leche por muestra es de 120 ml. Las muestras son colocadas en bolsas de polietileno y son selladas al vacío con el equipo Tor-Rey, EVD4, CE posteriormente se introducen en la cámara de presurización del equipo de APH High Pressure Food Processor de Avure Technologies, modelo 2 L., realizando así la presurización bajo las condiciones que se muestran en el Cuadro (5) a temperatura ambiente. Es importante mencionar que no se realizó ningún diseño experimental. Las condiciones se programaron de manera aleatoria en el software del equipo de APH. Únicamente se evaluó una sola vez cada condición de presurización.

Cuadro 5. Condiciones empleadas para procesar leche de vaca por APH.

Presión (MPa)	550	600
Tiempo (min)	CUT	CUT
	1	0.5
	4	1
	8	3
	16	6
	25	12

5.5. Determinación de la estabilidad microbiana de la leche presurizada y viabilidad de *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes* en leche cruda de vaca, procesada bajo la condición de equivalencia a la pasteurización

En el proceso de preparación, inoculación y análisis de las muestras se realiza bajo condiciones estériles. A la leche cruda se le realizan las determinaciones microbiológicas (Coliformes, BMA, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*), fisicoquímicas (pH, acidez) y la prueba de antibiótico. Para realizar la estabilidad microbiana de la leche presurizada, se emplea leche cruda presurizada, y para la viabilidad de *L. innocua* usa leche presurizada inoculada con 7 Log UFC/ml de *L. innocua* ambos tipos de sistemas son almacenados durante 10 días a 4°C. La cepa de *L. innocua* se activa previamente en caldo soya tripticasa. La condición con la que se procesan las muestras en este experimento es aquella presión y tiempo que haya resultado ser equivalente a la pasteurización en el experimento anterior. En este estudio se usa la leche pasteurizada comercial y leche cruda que fue pasteurizada a 63°C por 30 min (como controles). Las muestras de leche pasteurizada se colocan en bolsas de polietileno para ser selladas al vacío, esto con la finalidad de que todas las muestras tengan el mismo proceso de empaquetado. El volumen de leche empleado para cada sistema fue de 120 ml (recordar que el volumen de leche siempre se mide con una probeta previamente esterilizada) y se vierte en una bolsa de polietileno que es sellada al vacío y nuevamente ésta se colocada dentro de una segunda bolsa de polietileno que se vuelve a sellar al vacío. El monitoreo se realizó a los tiempos 0 (el mismo día que se presurización) y 240 h (día 10 de almacenamiento), se emplearon 2 muestras por sistema para ser evaluadas. En cada tiempo de monitoreo se determinan microorganismos indicadores (Coliformes, BMA) y patógenos (*L. monocytogenes*, *Salmonella* y *S. aureus*) además de la medición de pH y acidez, excepto para las muestras de leche inoculadas con *L. innocua*, cuya determinación fue únicamente de *Listeria*. Las determinaciones microbiológicas y fisicoquímicas se realizaron por triplicado de la misma unidad experimental.

5.6. Cinética de inactivación de *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes* en leche UHT

Leche entera UHT marca LALA fue empleada para realizar las cinéticas de inactivación de *L. innocua*. Todo el proceso de preparación e inoculación de muestras se hace bajo condiciones estériles. A la leche UHT previamente se le realiza la determinación de bacterias mesófilas aerobias, coliformes, *S. aureus* y *Listeria* para corroborar la esterilidad del alimento, bajo los procedimientos establecidos por las normas oficiales mexicanas correspondientes para cada microorganismo.

5.6.1. Preparación y presurización de las muestras de leche UHT

Se utilizan dos muestras para cada condición de presurización a evaluar (Cuadro 6) con un volumen de 20 ml de leche para cada una (la leche se mide con una probeta estéril y se coloca dentro de una bolsa de polietileno para cada muestra), a cada muestra se le inoculan 7 Log UFC/ml de *L. innocua* que representan 200 µl del cultivo activado previamente; posteriormente las muestras se sellan al vacío con el equipo Tor-Rey, EVD4, CE luego cada muestra se introduce dentro de una segunda bolsa de polietileno (para asegurarse que no haya contaminación del equipo de presurización por rotura) que también se sella al vacío. Una vez que están selladas las muestras se procesan con el equipo de altas presiones hidrostáticas High Pressure Food Processor de Avure Technologies, modelo 2 L. Las muestras de leche se introducen de acuerdo a la condición a evaluar dentro de la cámara de presurización la cual emplea 2 L de agua bidestilada como medio transmisor de la presión, la cámara se cierra y las condiciones se establecen en el software del equipo que tiene un programa llamado RSView32. Después de la presurización a las muestras se les determina la población sobreviviente de *L. innocua* mediante la técnica Miles-Misra que consiste en colocar 20 µl de cada dilución a sembrar por triplicado en agar soya tripticasa de cada muestra a analizar. Las placas se incuban a 37°C por 24 h. Los resultados se expresan en UFC/ml y en Log UFC/ml.

El CUT (Tiempo de levantamiento ó tiempo que tarda el equipo de APH en llegar a determinada presión) es una condición que debe ser evaluada siempre para saber qué efecto de reducción tiene sobre la población de *L. innocua* y en base a esa cantidad inactivada realizar los cálculos correspondientes. El CUT se determina para cada presión, en el Cuadro 6 se muestran las condiciones evaluadas a temperatura ambiente, en leche UHT entera. No se realizó ningún diseño estadístico experimental, las dos muestras que se utilizan por cada condición de presurización son consideradas como pseudoréplicas.

Cuadro 6. Condiciones de presurización evaluadas en la inactivación de *L. innocua* en leche UHT entera.

Presión (MPa)	350	450	550	600
Tiempo (min)	CUT	CUT	CUT	CUT
	5	2	1	0.5
	10	4	3	1.0
	15	8	8	1.5
	20	12	14	2.0
	30	14	20	

Tiempo de levantamiento (CUT, por sus siglas en inglés)

5.6.2. Modelamiento matemático de la cinética de inactivación de *L. innocua* en leche UHT

Se emplea el programa estadístico sigma plot versión 10.00 para realizar el modelamiento matemático de la inactivación de *L. innocua* mediante la aplicación de modelos no lineales, como el de Weibull y Gompertz que son lo que se usan en este trabajo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación del efecto del tiempo y presión sobre inactivación microbiana en leche cruda de vaca para establecer la equivalencia a la pasteurización.

La leche cruda empleada para realizar el experimento a 550 MPa (Lote I) presentó por contaminación de origen *Salmonella* y *Listeria* spp (Cuadro 7), lo que indica que el establo de donde se obtuvo no lleva a cabo las buenas prácticas de ordeño. Por otro lado, ésta leche presentó un contenido graso de 3.87 % y una acidez de 17.55 °D con un pH de 6.73 los cuales son un indicativo de la frescura de la leche, pues ésta era obtenida de los primeros ordeños de la mañana; la prueba de antibiótico resultó negativa (Cuadro 8). Los resultados microbiológicos y fisicoquímicos fueron similares para el lote de leche empleada para evaluar el efecto del tratamiento a 600 MPa (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 7. Caracterización microbiológica de la leche cruda (Lote I).

Determinación microbiológica	Resultado
Coliformes	6.25 ± 0.048 Log UFC/ml
Bacterias Mesófilas Aerobias	7.69 ± 0.075 Log UFC/ml
<i>S. aureus</i>	7.15 ± 0.053 Log UFC/ml
<i>Listeria spp.</i>	Presencia
<i>Salmonella</i>	Presencia

Cuadro 8. Caracterización fisicoquímica de la leche cruda (Lote I)

Análisis fisicoquímico	Resultado
Acidez (°D)	17.55 ± 0.0000
pH	6.73 ± 0.0057
Grasa (%)	3.87 ± 0.0670
Antibiótico	Negativo

Los lotes de leche cruda empleados no fueron los mismos. Sin embargo se tuvo la incidencia de *Listeria* spp en ambos con cantidades de 2.5 Log UFC/ml en 25 ml de muestra, así mismo 3 Log UFC/ml de éste microorganismo son suficientes para causar un brote de listeriosis no invasiva en humanos (McLauchlin *et al.*, 2004).

Cuadro 9. Caracterización microbiológica de la leche cruda (Lote II)

Determinación microbiológica	Resultado
Coliformes	6.25 ± 0.020 Log UFC/ml
Bacterias Mesófilas Aerobias	9.16 ± 0.210 Log UFC/ml
<i>S. aureus</i>	7.52 ± 0.053 Log UFC/ml
<i>Listeria</i> spp.	Presencia
<i>Salmonella</i>	Ausencia

Cuadro 10. Caracterización fisicoquímica de la leche cruda (Lote II)

Análisis fisicoquímico	Resultado
Acidez (°D)	17.33 ± 0.010
pH	6.76 ± 0.0050
Grasa (%)	3.88 ± 0.0340
Antibiótico	Negativo

No se muestran las desviaciones estándar de las caracterizaciones microbiológicas en los lotes de leche presurizados (Cuadros 11 y 12), ya que se realizaron mediciones de la misma unidad experimental, en las cuales se emplearon dos muestras para cada condición a evaluar (consideradas como pseudoréplicas). La siembra microbiológica fue por triplicado. Los métodos para la determinación de coliformes y bacterias mesófilas aerobias se realizaron por vaciado en placa, el cual tiene un límite de detección <10 UFC/ml ó <1 Log UFC/ml, mientras que para *S. aureus* la técnica empleada fue extensión en superficie con un límite de detección de <10 UFC/ml ó <1 Log UFC/ml de UFC/ml.

El efecto del CUT siempre se debe cuantificar ya que durante el proceso de elevación de la presión normalmente se presenta inactivación microbiana. El

CUT 550 MPa presentó una duración de 1.20 ± 0.2834 min y provocó una reducción de 1 Log UFC/ml en las BMA, 2.43 Log UFC/ml de coliformes y 0.49 Log UFC/ml de *S. aureus*. A 600 MPa la duración del CUT es de 1.35 ± 0.033 min y generó reducciones de 2.37 Log UFC/ml de BMA, 2.84 Log UFC/ml de coliformes y 1.27 Log UFC/ml de *S. aureus*. Para los patógenos *Salmonella* y *Listeria* el CUT no tiene ningún efecto de inactivación. Los tiempos de presurización evaluados a 550 MPa (Cuadro 11) reducen coliformes a partir de 1 min hasta los 16 min de presurización, llegando a cantidades de <10 UFC/ml ó bien menos de <1 Log UFC/ml. Esta cantidad cumple con lo establecido en la NOM-243-SSA1-2010 de leche pasteurizada, que establece un nivel de ≤ 10 UFC/ml de coliformes. La población de BMA a los tiempos evaluados de 1 a 8 min (Figura 2) presentó concentraciones fuera de la norma, la cual establece 30,000 UFC/ml ó 4.47 Log UFC/ml de BMA en leche pasteurizada. A 16 min de presurización se presentó una cantidad de mesófilos permitida, pero ese tiempo no logró inactivar a los patógenos, por lo cual no puede ser considerada como equivalente a la pasteurización. De acuerdo a la bibliografía los microorganismos patógenos pueden ser inactivados en rangos de presión de 200-700 MPa (Patterson y Kilpatrick, 1998, Ponce *et al.*, 1999; Tholozan *et al.*, 2000, Cook, 2003), pero todo depende del tipo de bacterias que se estén evaluando, pues la *Listeria* es Gram-positiva y *Salmonella* es Gram-negativa. *Listeria* se considera que es barorresistente por la composición de su pared celular que le confiere protección ante agentes físicos, mientras que *Salmonella* es más susceptible a la APH y aun así no pudo ser inactivada. Debe aclararse que la leche cruda presentaba contaminación microbiana importante, que puede causar interferencia debido a la competencia por nutrientes con los demás microorganismos.

Las muestras procesadas a 550 MPa y aquellas que fueron inoculadas estuvieron sometidas a una temperatura promedio de $29.09 \pm 1.13^{\circ}\text{C}$ estas temperaturas no tienen ningún efecto en la inactivación de bacterias indicadoras ni patógenas, pues para las primeras se requiere de temperaturas superiores a 40°C y para las segundas más de 60°C .

Cuadro 11. Caracterización microbiológica de la leche procesada a 550 MPa

Tiempo (min)	Microorganismos indicadores		Microorganismos patógenos		
	BMA Log UFC/ml	Coliformes Log UFC/ml	<i>S. aureus</i> Log UFC/ml	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>
CUT	6.67	3.82	6.66	Presencia	Presencia
1	6.18	<1	6.10	Presencia	Presencia
4	5.19	<1	5.47	Presencia	Presencia
8	5.10	<1	4.48	Presencia	Presencia
16	2.69	<1	1.00	Presencia	Presencia

En la leche que fue procesada a 600 MPa (Cuadro 12) se observa que a partir de 3 min de tratamiento se alcanza una reducción de 2.2 ciclos logarítmicos de BMA (Figura 2), y a 6 min se reduce en 3.02 ciclos logarítmicos. La población de coliformes se encontró que era <1 Log UFC/ml a partir de los tratamientos de 1 min. Con 12 min de presurización la leche presenta una reducción de 4.49 Log UFC/ml de BMA. En algunas investigaciones realizadas por Dogan y Erkman, (2004) en jugo de naranja aplicaron 600 MPa por 15 min logrando inactivar 8 Log UFC/ml de BMA, esto demuestra que la inactivación de estas bacterias en la leche no tiene el mismo efecto que en un jugo u otro alimento, debido a que la composición de la leche tal como su contenido de grasa, proteínas, minerales, carbohidratos y aminoácidos pueden conferir protección a los microorganismos del efecto de la APH (Patterson *et al.*, 1995). A 550 MPa se tiene menor inactivación de BMA que a 600 MPa (Figura 2).

Cuadro 12. Caracterización microbiológica de la leche procesada a 600 MPa

Tiempo (min)	Microorganismos indicadores		Microorganismos patógenos		
	BMA Log UFC/ml	Coliformes Log UFC/ml	<i>S. aureus</i> Log UFC/ml	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>
CUT	6.79	3.41	6.25	Presencia	Ausencia
0.5	6.30	2.41	5.72	Presencia	Ausencia
1	5.43	<1	4.97	Presencia	Ausencia
3	4.59	<1	3.92	Presencia	Ausencia
6	3.77	<1	3.45	Ausencia	Ausencia
12	2.3	<1	< 1	Ausencia	Ausencia

El proceso a 600 MPa y 12 min satisface con los parámetros microbiológicos establecidos para una leche pasteurizada, ya que presenta ausencia de patógenos y un contenido adecuado de indicadores (Figura 2), por lo cual esta condición es considerada como equivalente al proceso de pasteurización. Las muestras procesadas a 600 MPa con y sin inóculo de *L. innocua* presentaron una temperatura promedio de $29.15 \pm 1.85^\circ\text{C}$ la cual no influye en la inactivación de las bacterias patógenas e indicadores.

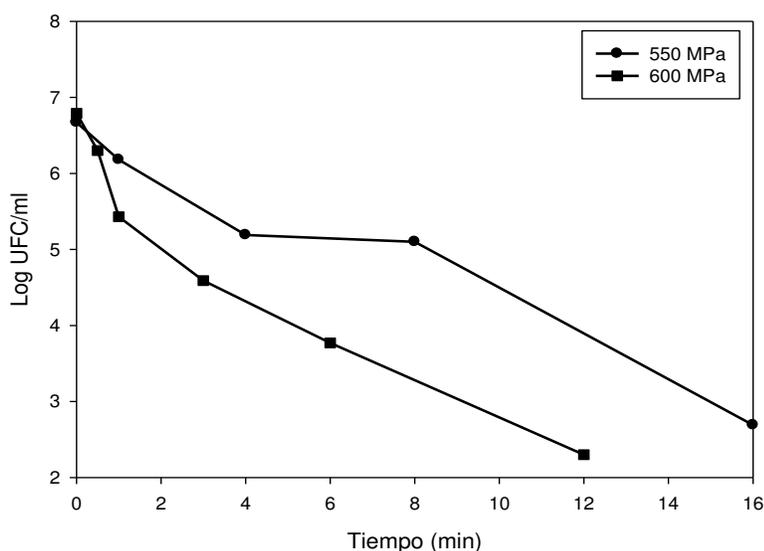


Figura 2. Inactivación de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en leche presurizada a 550 y 600 MPa

Las barras de error en la Figura 2 no se muestran porque los datos graficados pertenecen a muestras de la misma unidad experimental.

Suponiendo que la leche cruda hubiera contenido *Salmonella* por contaminación de origen, Guan *et al.*, (2005), reportaron que a 600 MPa se logra una inactivación de 5.1 Log UFC/ml de *Salmonella typhi* con 10 min de tratamiento, por lo que con 12 min de presurización *Salmonella* sería inactivada. Además, éste microorganismo es Gram-negativo y es más susceptible a la alta presión, es decir, sí *Listeria* que es más resistente a la APH logra ser inactivada, entonces *Salmonella* también lo será.

En el sistema de leche cruda evaluado a 550 MPa e inoculado con 7 Log UFC/ml de *L. innocua* (Cuadro 13) no se logra la inactivación de este microorganismo a ninguno de los tiempos evaluados, pero a 600 MPa por 12 min sí se inactiva (Cuadro 14), corroborando que esta condición es capaz de inactivar alrededor de 9.5 Log UFC/ml de *Listeria*, pues la leche por contaminación de origen presentó 2.5 Log UFC/ml y se le inocularon 7 Log UFC/ml.

Cuadro 13. Análisis de *Listeria* en leche cruda inoculada y procesada a 550 MPa

Tiempo (min)	CUT	1	4	8	16
<i>Listeria</i>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia

Cuadro 14. Análisis de *Listeria* en leche cruda inoculada y procesada a 600 MPa

Tiempo (min)	CUT	0.5	1	3	6	12
<i>Listeria</i>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia

Shimada *et al.*, (1993) aplicaron una presión de 550 MPa por 15 min a una solución reguladora de fosfatos conteniendo *L. innocua*, e inactivaron 8 Log UFC/ml. Esto implica que la composición del medio es importante para lograr la inactivación microbiana, ya que en la leche no se tiene el mismo resultado debido a que ésta contiene algunas sales como citrato y fosfato disueltos, los cuales funcionan como reguladores del pH. Incluso iones divalentes como el calcio y

magnesio protegen las membranas celulares durante la presurización, por lo cual según Buzrul *et al.*, (2008), mencionan que se requieren tratamientos más severos de presurización para inactivar patógenos y otras células microbianas en una matriz compleja como la leche entera. Esto último queda demostrado al aplicar la condición de 600 MPa durante 12 min en el cual los 9.5 Log UFC/ml se inactivan. Algo semejante obtienen Ulmer *et al.*, (2000), pero en leche UHT y a temperatura de 45°C, pues con la aplicación de calor resulta más fácil la inactivación. Sin embargo, en este trabajo las temperaturas a las cuales estuvieron sometidas las muestras no superaron los 30°C. La inactivación microbiana por APH puede deberse a que la presión genera poros en las membranas celulares ocasionando la pérdida de fluidos intracelulares y componentes importantes para la célula. De esta forma la APH puede tener un efecto letal en las células microbianas logrando reducir la población microbiana de los alimentos (Tholozan *et al.*, 2000). Por lo anterior, se realizó un estudio de estabilidad microbiana de la leche presurizada, para corroborar que realmente a través del tiempo de almacenamiento las bacterias permanecen inactivas.

6.2. Estabilidad microbiana de la leche presurizada y viabilidad de *L. innocua* como microorganismos subrogado *L. monocytogenes* en leche procesada bajo la condición de equivalencia a la pasteurización

El lote de leche cruda empleado para el estudio de estabilidad microbiana presentó *Listeria* por contaminación de origen y mostró ausencia de *Salmonella* (Cuadro 15). Por otro lado, el contenido graso fue de 3.78 % (v/v) y una acidez de 16.67 °D (Cuadro 16). La incidencia de *Listeria* en los lotes de leche evaluados fue alta, pues en todos se encontró la presencia de esta bacteria. Debido a lo anterior, según datos de SAGARPA en 2010, de 1,200 muestras de leche analizadas de 4 establos de la ciudad de México, 294 fueron positivas a *Listeria*, así que el consumo de leche de vaca sin antes haber sido sometida a un tratamiento previo, es riesgoso, y además aunque la leche haya sido procesada

puede sufrir una contaminación post-proceso y puede aumentar la población microbiana si no se mantiene una refrigeración adecuada desde su producción hasta ser consumida.

Cuadro 15. Caracterización microbiológica de leche cruda (Lote III)

Determinación microbiológica	Resultado
Coliformes	5.48 ± 0.049 Log UFC/ml
Bacterias mesófilas aerobias	7.07 ± 0.042 Log UFC/ml
<i>S. aureus</i>	5.75 ± 0.194 Log UFC/ml
<i>Listeria spp.</i>	Presencia
<i>Salmonella</i>	Ausencia

Cuadro 16. Caracterización fisicoquímica de leche cruda (Lote III)

Análisis fisicoquímico	Resultado
Acidez (°D)	16.67 ± 0.0570
pH	6.67 ± 0.0057
Grasa (%)	3.78 ± 0.0152
Antibiótico	Negativo

Los microorganismos evaluados fueron los mismos que establece la norma para leche pasteurizada. Los sistemas evaluados fueron leche cruda presurizada, leche pasteurizada (la leche cruda de vaca empleada para éste estudio se pasteurizó a 63°C por 30 min.), leche pasteurizada comercial y leche cruda inoculada con 7 Log UFC/ml de *L. innocua*. Las muestras se presurizaron y se determinó la viabilidad de *L. innocua* empleado como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes*. La temperatura promedio a la que estuvieron sometidas las muestras de leche cruda e inoculada con *L. innocua* fue de 28.18± 1.11°C durante el procesamiento a 600 MPa. En el Cuadro 17 se muestra que a 240 h de almacenamiento la población de BMA de leche presurizada aumentó de 1.87 a 2.84 Log UFC/ml, por lo tanto solo hubo un incremento de 0.97 Log UFC/ml. Algo semejante ocurrió con la leche pasteurizada y pasteurizada

comercial, las cuales tuvieron incrementos de 1.44 y de 1.64 Log UFC/ml, respectivamente. Los tres tipos de leche se encuentran dentro de los parámetros microbianos para una leche pasteurizada, pues la NOM-243-SSA1-2010 y la NOM-091-SSA1-1994 establece como límite máximo 4.47 Log UFC/ml de BMA. Los coliformes y *S. aureus* durante los 10 días de almacenamiento siempre se mantuvieron dentro del límite permitido ≤ 1 Log UFC/ml lo que demuestra la buena estabilidad de la leche. *S. aureus* permaneció inactivo en este periodo, lo cual es muy importante, ya que ha sido el agente causal de enfermedades transmitidas por consumo de leche cruda, mal pasteurizada o deficientes prácticas post-proceso (Erkmen y Karatas, 1997).

Cuadro 17. Caracterización microbiológica y fisicoquímica de los sistemas evaluados de leche almacenados durante 4°C a 10 días

Sistema	Tiempo (h)	Microorganismos indicadores		Microorganismos Patógenos			Parámetros fisicoquímicos	
		BMA LogUFC/ml	Coliformes LogUFC/ml	<i>S. aureus</i> LogUFC/ml	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>	pH	Acidez (°D)
Leche presurizada	0	1.87	<1	<1	Ausencia	Ausencia	6.69	18.33
	240	2.84	<1	<1	Ausencia	Ausencia	6.73	20.33
Leche pasteurizada (63°C/30min)	0	<1	<1	<1	Ausencia	Ausencia	6.63	19.6
	240	1.44	<1	<1	Ausencia	Ausencia	6.69	21.67
Leche pasteurizada comercial	0	<1	<1	<1	Ausencia	Ausencia	6.64	19.3
	240	1.65	<1	<1	Ausencia	Ausencia	6.69	20.33

En cuanto a los patógenos, cabe mencionar que *Listeria* estaba presente en una cantidad de 2.5 Log UFC/ml, ésta cantidad de células fueron inactivadas a 600 MPa por 12 min y después a las 240 h el patógeno se mantuvo ausente.

Fueron evaluados los parámetros fisicoquímicos de la leche presurizada, los cuales a las 0 y 240 h mostraron valores de 6.69 a 6.73 de pH y 19 a 26 °D

respectivamente (Cuadro 17), mientras que la leche pasteurizada y la pasteurizada comercial presentaron valores de pH de 6.62 a 6.69 y 6.64 a 6.68 respectivamente, y valores de acidez de 19.6 a 21.6 y 19 a 20 °D (Cuadros 17). La norma que rige la calidad de la leche pasteurizada NOM-243-SSA1-2010 no especifica qué pH debería tener el producto, pero el valor de acidez establecido es de 13-17 °D es decir, 1.3-1.7 g/L de ácido láctico. La leche pasteurizada comercial no cumple con esos valores de acidez, tampoco los otros dos tipos de leche, para la leche presurizada esto pudo ser ocasionado a que la carga microbiana inicial antes de ser procesada era muy alta de tal forma que al tiempo 0 h había presencia de bacterias que pueden ser las responsables de la alcalinización. La flora microbiana sobreviviente en la leche procesada por APH descompone la albúmina formando amoniaco, aunque también influyen otros factores como el contenido de caseína, los fosfatos, citratos, ácido carbónico, ácido láctico presentes en la leche. Aunado a esto, el proceso de APH puede influir en el incremento del pH, pues a las 0 h la leche presurizada presentó una acidez de 18.3 °D y antes de ser procesada tenía 16.7 °D el incremento fue de 1.7 °D mientras que el pH tuvo un incremento de 0.02 unidades. La leche que fue inoculada con *L. innocua* en una cantidad de 7 Log UFC/ml (Cuadro 18), al tiempo cero y a las 240 h presentó ausencia del microorganismo.

Cuadro 18. Análisis de *Listeria* en leche cruda inoculada, procesada a 600 MPa por 12 min y almacenada a 4°C

Tiempo de almacenamiento (h)	Determinación de <i>Listeria innocua</i>
0	Ausencia
240	Ausencia

Aquellos alimentos en los que el riesgo potencial de crecimiento de la *Listeria* sea tal, se permite menos de 100 UFC/g ó ml durante el almacenamiento. La leche es un alimento de alto riesgo por lo cual no hay tolerancia ni para una célula (Norma de *Listeria monocytogenes* de alimentos listos para su consumo, Canadá, 2011), por lo tanto debe haber ausencia total de éste microorganismo

después de los 10 días de almacenamiento, lo mismo aplica para *Salmonella*, dichos resultados se lograron en este experimento.

6.3. Cinética de inactivación de *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes*

El CUT presenta diferentes valores para cada presión de tal forma que se ha observado, que a medida que la presión incrementa el CUT también, pues valores de 1.35 ± 0.0312 y 0.96 ± 0.0320 min para las presiones de 600 y 350 MPa respectivamente fueron obtenidos en durante el proceso, Cuadro (19). Sin embargo hay investigaciones en las que se reportan valores aún más prolongados del CUT en presiones menores, como Guerrero *et al.*, (2011) reportan a 414 MPa un valor CUT de 3.2 ± 0.04 min, esto se puede explicar en base a que las distintas variaciones de duración del CUT van a depender del sistema y tamaño del equipo empleado para generar la presión deseada.

Cuadro 19. Efecto del CUT sobre la población de *L. innocua*

Presión (MPa)	CUT (min)	Reducciones Log en el CUT
350	0.96 ± 0.0320	0.220 ± 0.0789
450	1.21 ± 0.0423	0.2021 ± 0.0082
550	1.25 ± 0.0523	0.288 ± 0.0455
600	1.35 ± 0.0312	1.040 ± 0.0963

En el cuadro (19), se muestra que entre más duración tenga el CUT más células microbianas serán inactivadas, de tal forma que a 600 MPa se tiene una duración del CUT de 1.35 ± 0.0312 min que generó una reducción de 1.040 ± 0.0963 Log UFC/ml de *L. innocua*. Lo deseable es que el tiempo de duración del CUT sea corto.

Cuadro 20. Efecto del procesamiento con APH sobre la inactivación de *L. innocua*

Presión (MPa)	Tiempo (min)	Log UFC/ml	Log N/N ₀
350	0	7.120	0
	5	6.220	-0.849
	10	4.340	-2.775
	15	3.610	-3.511
	20	1.698	-5.424
	30	1.698	-5.424
450	0	7.397	0
	2	5.720	-1.677
	4	3.619	-3.778
	8	1.698	-5.698
	12	1.698	-5.698
	14	1.698	-5.698
550	0	7.032	0
	1	3.221	-3.811
	3	2.221	-4.811
	8	1.698	-5.334
	14	1.698	-5.334
	20	1.698	-5.334
600	0	6.574	0
	0.5	3.698	-2.875
	1.0	1.698	-4.875
	1.5	1.698	-4.875
	2.0	1.698	-4.875

El tiempo 0 representa al CUT y la población microbiana es la que se considera como la inicial que entra al proceso de APH en cada condición de tiempo evaluada. La relación logarítmica de (N/N_0) es una forma de representar la tasa de inactivación, donde N_0 es la población inicial en (UFC/ml), N es la población sobreviviente después de un tiempo de presurización en (UFC/ml).

En la Figura (3) se muestra gráficamente los datos del Cuadro (20), con respecto al Log UFC/ml, en dicha figura no se muestran las desviaciones estándar ya que son datos obtenidos de la misma unidad experimental. Además en esta

misma figura se observa claramente que a medida que se fue incrementando la presión durante el proceso, la inactivación también aumentaba, de tal forma que a 600 MPa se emplearon tiempos muy cortos de presurización, máximo 2 min.

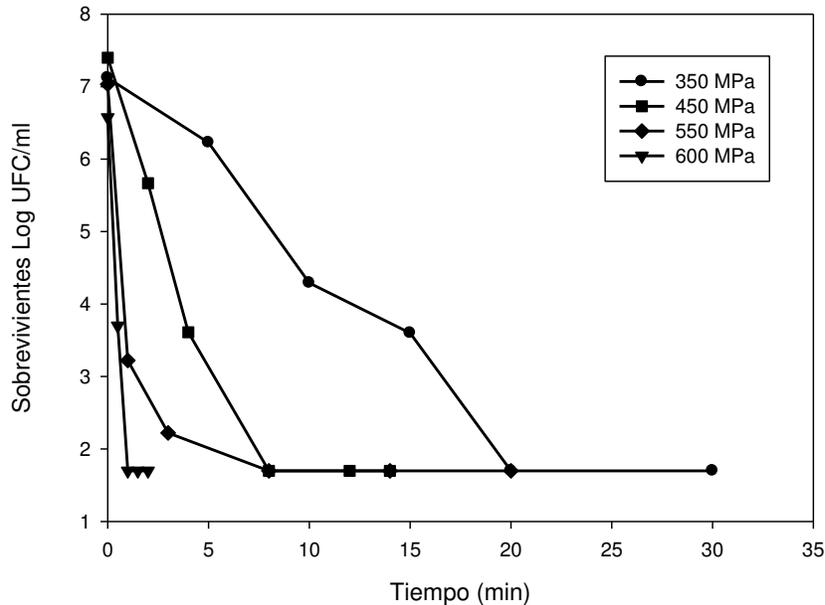


Figura 3. Efecto de la alta presión hidrostática en la inactivación de *L. innocua* en leche UHT entera, en función del tiempo de exposición

Erkman y Dogan, (2004b) aplican 400 MPa durante 5 min y reducen 3.5 Log UFC/ml de *L. monocytogenes*, mientras que en este trabajo a 450 MPa por 4 min se reducen 3.6 Log UFC/ml de *L. innocua*, esto demuestra que aumentando la presión el efecto de inactivación es mayor. El que no se logren altos niveles de inactivación microbiana a presiones menores de 450 MPa en tiempos cortos, puede deberse a factores como el tipo de microorganismo a inactivar; hay que recordar que *L. innocua* es una bacteria Gram-positiva, su pared celular es más gruesa, por lo tanto le confiere mayor protección lo que implica que requiere de condiciones de presión mucho más severas para ser inactivada; el tipo de sustrato también afecta, de tal forma que (Téllez *et al.*, 2001; Velázquez *et al.*, 2005) demostraron que la inactivación microbiana en leche es más complicada que en buffer de fosfatos, jugo de naranja y néctares. Una forma de lograr mayor inactivación a presiones menores a 450 MPa empleando tiempos cortos podría ser

la combinación de la temperatura con la APH, sin embargo, en este trabajo, la finalidad fue aplicar el proceso de presurización a temperatura ambiente.

Las muestras presurizadas a 350, 450, 550 y 600 MPa fueron procesadas a una temperatura promedio de 27.3 ± 2.3 , 27.0 ± 2.2 , 28.7 ± 1.4 y $31.2 \pm 0.8^\circ\text{C}$ respectivamente.

Es importante aclarar y explicar que las reducciones logarítmicas que se encuentran en el Cuadro (20) y Figura (3) muestran tiempos de tratamientos con el valor de 1.698 Log UFC/ml ésta cantidad representa el límite de detección del método de conteo utilizado (Miles-Misra), solo que no se puede reportar como "0" Log UFC/ml de modo que a 550 MPa al tiempo 0 (tratamiento CUT) tiene 7.032 Log UFC/ml y los tiempos de inactivación que son considerados a partir de 8-20 min presentan 1.698 Log UFC/ml entonces, matemáticamente se reducen 5.334 ciclos logarítmicos, cuando experimentalmente no existen colonias en la caja petri, pero debe considerarse el límite de detección del método de recuento utilizado. La mayoría de los métodos de conteo microbiológico presentan éste tipo de limitaciones, motivo que puede generar la confusión de que el proceso empleado no reduce la cantidad inoculada.

Buzrul *et al.*, (2008) aplicaron 400 MPa durante 24 min reduciendo 6 Log UFC/ml *L. monocytogenes* en leche UHT entera; los tiempos evaluados en este trabajo a 450 MPa no requirieron tiempos superiores a los 14 min para lograr inactivar al microorganismo. A 600 MPa fueron los tiempos de 1-2 min que mayor inactivación presentaron (tomando en cuenta el límite de detección del método de conteo). Chen *et al.*, (2003) aplican hasta 10 min de tratamiento a 600 MPa inactivando 7.5 Log UFC/ml de *L. monocytogenes* en leche UHT entera, pero hay que considerar que el CUT a 600 MPa contribuyó a reducir 1.040 Log UFC/ml de *L. innocua* dejando menos células sobrevivientes en los tiempos de inactivación evaluados. La condición de 0.5 min a 600 MPa reduce 2.87 Log UFC/ml, de esta forma se demuestra que con los estudios de inactivación realizados se puede tener una aproximación de las condiciones (presión y tiempo) en las que un alimento podría ser procesado por APH para preservar su inocuidad. La leche UHT entera comercial es un alimento estéril, pues se le realizaron las

determinaciones de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes e incluso se le determinó *Listeria* spp y *Salmonella* arrojando resultados negativos para éstos dos patógenos, y para los indicadores presentó <10 UFC/ml de BMA y de coliformes. La acidez de la leche UHT fue de 20 ± 0.00 °D ó 0.2 g/L de ácido láctico, un pH de 6.7 ± 0.01 y 0.83 ± 0.00 % (v/v) de grasa. Microbiológicamente la leche UHT es un producto que no representa la contaminación microbiana real que puede tener un alimento. Se escalaron algunas condiciones de la cinéticas realizadas en UHT a 550 y 600 MPa en leche cruda de vaca, donde aplicando tiempos cortos no se lograba la inactivación de *L. innocua* inoculada a la leche, pues a 600 MPa por 3 min aún estaba presente mientras que en las cinéticas en UHT a 2 min a esa misma presión estaba ausente. A 550 MPa en leche cruda también estaba presente la bacteria con 16 min de presurización y en leche UHT con solo 14 min se logra la inactivación de *L. innocua*. Estos son aspectos que se deben considerar, nuevamente haciendo referencia al tipo de sustrato, su composición y pH, tipo de bacteria a evaluar, magnitud de la presión, tiempos de tratamiento, etc. que representan un conjunto de factores que influyen para tener éxito en la inactivación de microorganismos, principalmente patógenos. Cuando se pretende procesar un alimento por APH, es importante considerar su composición nutrimental, propiedades fisicoquímicas así como los microorganismos patógenos a los que se encuentra susceptible, los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los que ha estado implicado y determinar sí puede ser un alimento que pueda ser candidato a su procesamiento, ya que al final del proceso debe mantener sus propiedades sensoriales, nutritivas y una estabilidad microbiana tal que, cuando llegue a manos del consumidor éste alimento no represente un riesgo para su salud y sea de su agrado.

Un comportamiento parecido a la Figura 4 es reportado por (Tay *et al.*, 2003) en dos cepas de *L. monocytogenes* tratadas a 450-550 MPa en cuya inactivación tiene disminuciones rápidas de la población microbiana, además de lograr mayor inactivación incrementando los tiempos del proceso. *L. innocua* puede ser más resistente a la APH cuando se encuentra en la leche que cuando está en un buffer de fosfatos, pues en éste último aplicando 345 MPa por 20 min

se obtiene una reducción de 7 Log UFC/ml de *L. monocytogenes*, mientras que 2 Log UFC/ml son reducidos en leche UHT entera (Chen y Hoover, 2003).

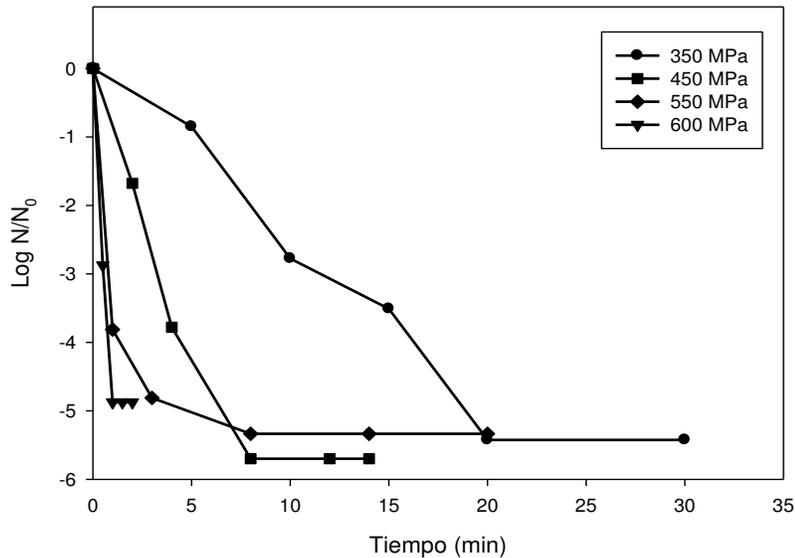


Figura 4. Inactivación de *L. innocua* a presiones de 350-600 MPa

El comportamiento de la cinética de inactivación de *L. innocua* puede explicarse utilizando modelos matemáticos. A simple vista se puede distinguir que en la Figura 4 ninguna curva sigue un comportamiento de primer orden, por lo cual modelos no lineales como el de Weibull fue aplicado a las cuatro curvas, esto se muestra en la Figura 5, en la cual se observa que a la presión de 600 MPa el modelo presenta buen ajuste, seguido a 450 MPa, 550 y por último 350 MPa.

Un ajuste semejante a 450 MPa obtiene Chen, (2006) al aplicar el modelo de Weibull a la cinética de inactivación de *Salmonella* entérica. En el parámetro n se obtuvieron valores menores de 1 para cada presión evaluada, (Cuadro 21) lo que indica que la concavidad de las curvas es hacia arriba, esto significa que todos los miembros vulnerables de la población perecen rápidamente, y a medida que avanza el proceso de inactivación puede ir dejando sobrevivientes cada vez más resistentes, por que se requiere de más tiempo para lograr la inactivación. Un comportamiento semejante obtiene Buzrul *et al.*, (2008) en la inactivación de *E. coli* en leche UHT entera, en donde encuentra valores inferiores a 1 para n .

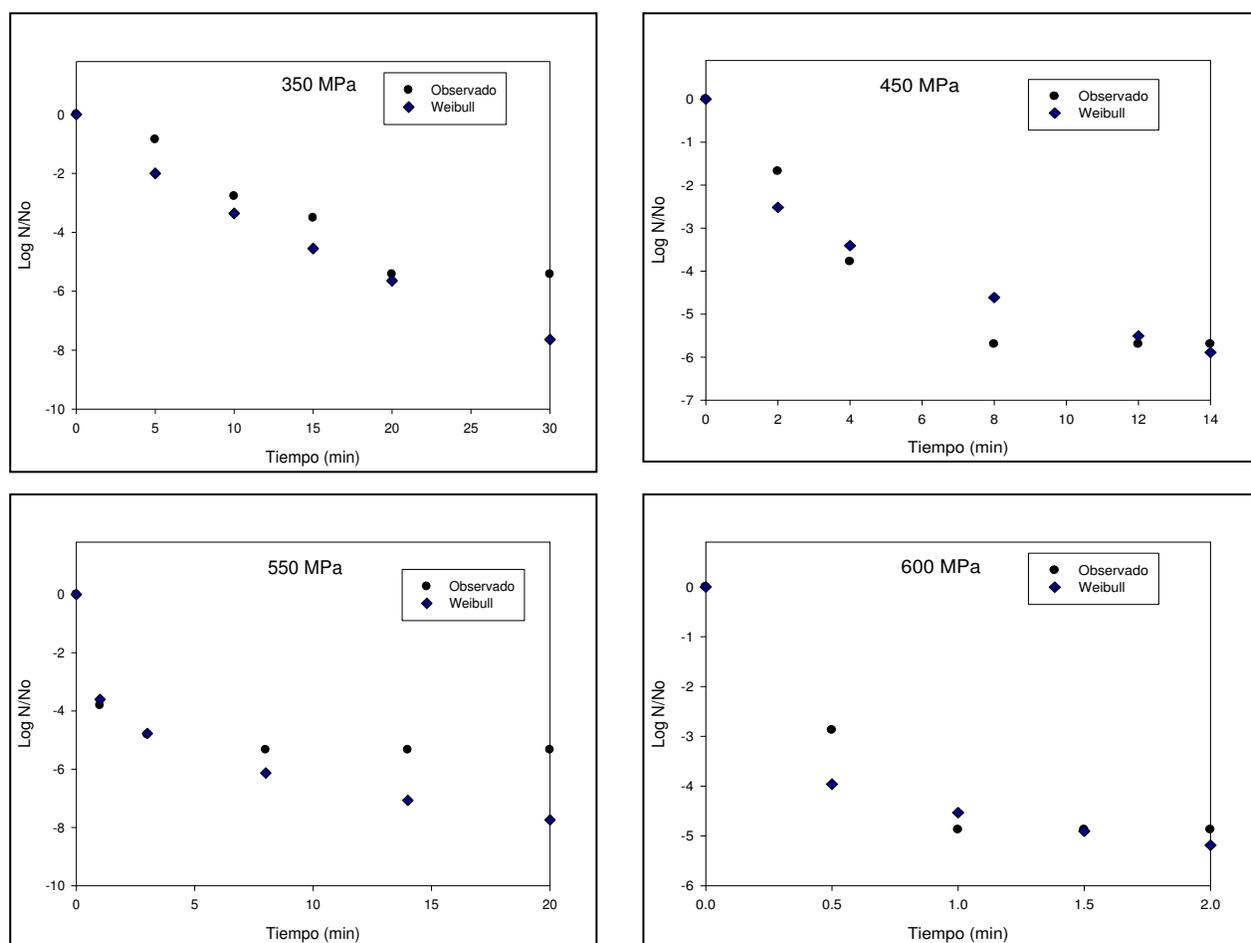


Figura 5. Aplicación del modelo de Weibull a la cinética de inactivación de *L. innocua* realizada a las presiones de 350-600 MPa.

Cuadro 21. Parámetros del modelo Weibull obtenidos para describir la inactivación de *L. innocua* en leche tratada con APH

Presión (MPa)	b	n	MSE ^a
350	0.599	0.750	1.924
450	1.860	0.440	0.523
550	3.605	0.255	2.370
600	4.532	0.194	0.280

^aMSE: Suma del cuadrado medio del error del modelo.

La constante o parámetro b es considerado como no lineal y refleja la pendiente de la curva de sobrevivencia, indicando que el microorganismo bajo

estudio muestra una resistencia media para ser inactivado. El valor de b incrementa conforme lo hace la presión, de tal forma que a mayor presión menor es la resistencia para ser inactivado el microorganismo, esto demuestra que a presiones mayores se requieren tiempos cortos para lograr la mayor inactivación posible. Chen y Hoover, (2003) obtienen valores de b con valores de 0.5-3 donde el microorganismo, muestra sensibilidad media a la presión aplicada de 500 MPa por 10 min.

Cuadro 22. Ecuaciones obtenidas a partir del modelo de Weibull ($\text{Log } N/N_0 = -bt^n$) para describir la inactivación de *L. innocua* en leche tratada con APH

Presión (MPa)	Ecuación
350	$\text{Log } N/N_0 = -0.599t^{0.750}$
450	$\text{Log } N/N_0 = -1.860t^{0.440}$
550	$\text{Log } N/N_0 = -3.605t^{0.255}$
600	$\text{Log } N/N_0 = -4.532t^{0.194}$

El modelo de Gompertz también fue aplicado en esta investigación, Figura 7, obteniendo como resultado valores de los parámetros de la ecuación ($\text{Log } N/N_0 = y_0 + a \cdot \exp(-\exp(-(t-t_0)/b))$), Cuadro 23, que emplea el paquete estadístico sigma plot versión 10, para realizar el ajuste del modelo. Según el modelo a medida que incrementa la presión el tiempo que se requiere para inactivar al microorganismo es menor. En base a la MSE el modelo de Gompertz presenta un buen ajuste a los datos de las presiones 450 y 600 MPa.

Cuadro 23. Parámetros de la ecuación de Gompertz obtenidos para describir la inactivación de *L. innocua* en leche tratada con APH

Presión (MPa)	a	b	t_0	y_0	MSE
350	7.048	-8.160	11.709	-5.539	0.242
450	7.774	-2.657	3.113	-5.704	7.09E-05
550	9.545	-0.866	0.433	-5.204	0.103
600	4.877	-0.068	0.508	-4.875	0.000

Cuadro 24. Expresiones matemáticas obtenidas a partir de la ecuación de Gompertz ($\text{Log } N/N_0 = y_0 + a \cdot \exp(-\exp(-(t-t_0)/b))$) para describir la inactivación de *L. innocua* en leche tratada con APH

Presión (MPa)	Ecuación
350	$(\text{Log } N/N_0 = -5.539 + 7.048 \cdot \exp(-\exp(-(11.709 - t_0)/-8.160)))$
450	$(\text{Log } N/N_0 = -5.704 + 7.774 \cdot \exp(-\exp(-(3.113 - t_0)/-2.657)))$
550	$(\text{Log } N/N_0 = -5.204 + 9.545 \cdot \exp(-\exp(-(0.433 - t_0)/-0.866)))$
600	$(\text{Log } N/N_0 = -4.875 + 4.877 \cdot \exp(-\exp(-(0.508 - t_0)/-0.068)))$

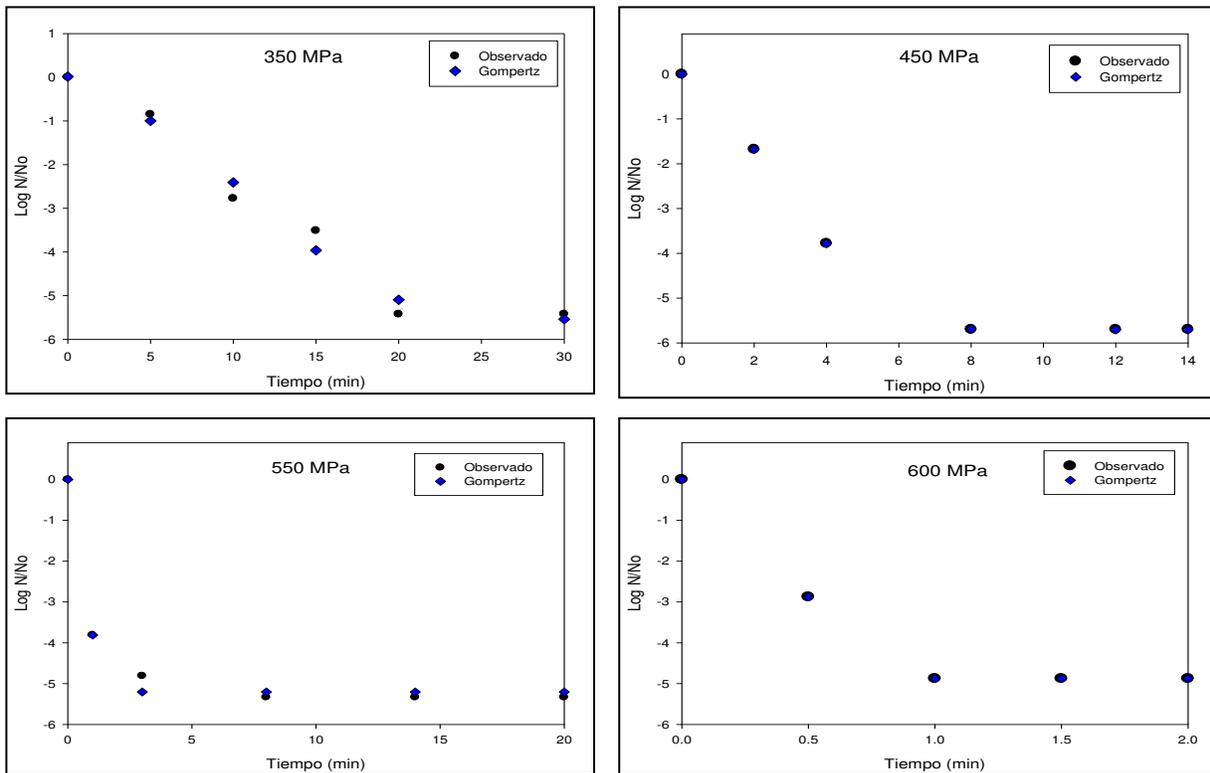


Figura 6. Aplicación del modelo de Gompertz a la cinética de inactivación de *L. innocua* realizada a las presiones de 350-600 MPa.

El modelo de Gompertz describe mejor los datos que el de Weibull para las cuatro presiones evaluadas, puede deberse a que el modelo de Gompertz emplea más parámetros en su ecuación, Figura 7.

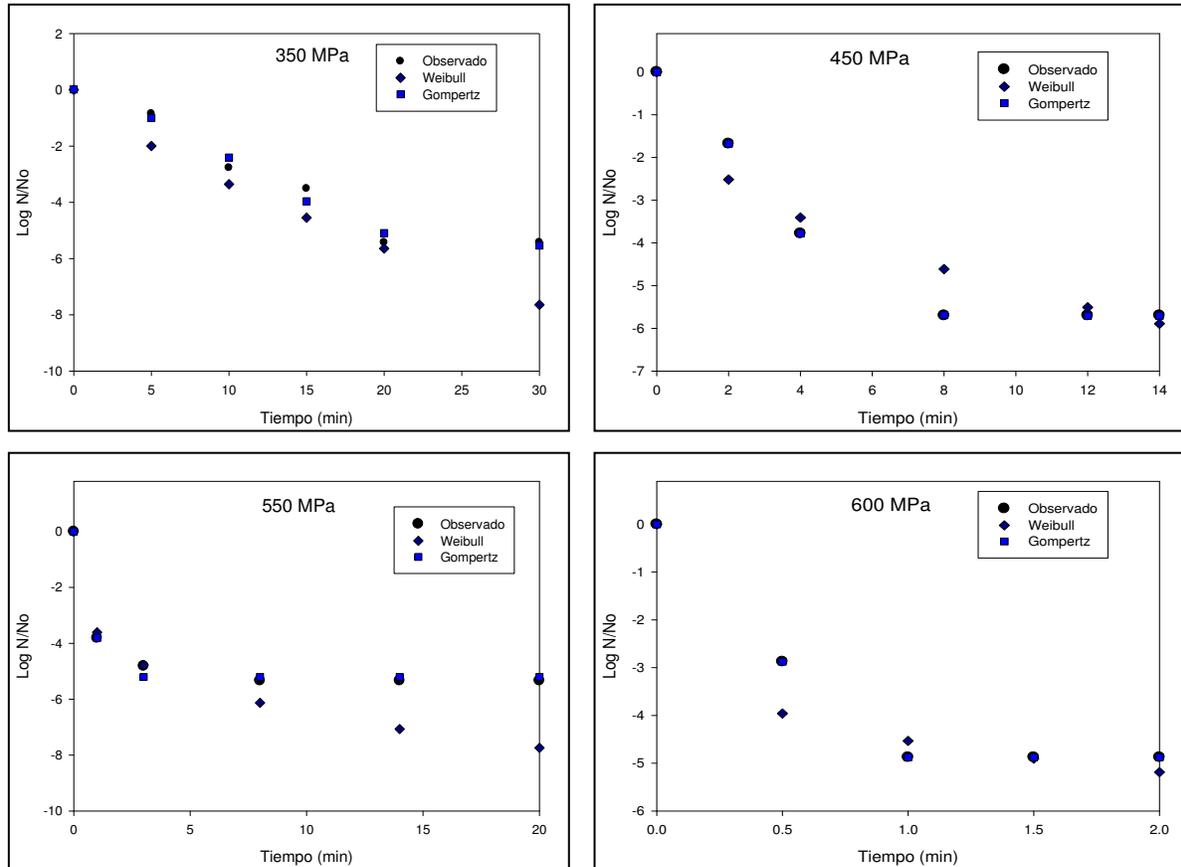


Figura 7. Aplicación del modelo de Weibull y Gompertz en la cinética de inactivación de *L. innocua* a presiones de 350-600 MPa

Chen y Hoover, (2003) también aplicaron el modelo de Gompertz en la inactivación de *Y. enterocolitica* mostrando mejor ajuste que el modelo de Weibull, pues presenta valores de MSE de 0.17-0.24 a presiones de 350-500 MPa, en cambio Weibull muestra valores de 0.1-0.35.

En esta investigación el modelo de Gompertz describe mejor el comportamiento no lineal de la inactivación de *L. innocua* que el modelo de Weibull, para lo cual deben emplearse un mayor número de datos experimentales para obtener un mejor ajuste de éstos modelos, obteniendo resultados y predicciones más certeros.

7. CONCLUSIONES

La alta presión hidrostática es una tecnología alternativa no térmica mediante la cual se puede procesar leche cruda de vaca logrando obtener los estándares microbiológicos que establece la norma oficial mexicana para leche pasteurizada.

Las variables de tiempo y presión evaluadas demostraron que 600 MPa durante 12 min es la condición de equivalencia a la pasteurización, capaz de inactivar 7 Log UFC/ml de *L. innocua*.

La estabilidad microbiana y fisicoquímica de la leche procesada por APH en condiciones de equivalencia a la pasteurización y almacenada durante 10 días a 4°C fue semejante a la de una leche pasteurizada comercial.

La leche presurizada presenta una calidad microbiana aceptable para poder ser consumida o bien usada para elaborar derivados lácteos, como yogurt o quesos frescos.

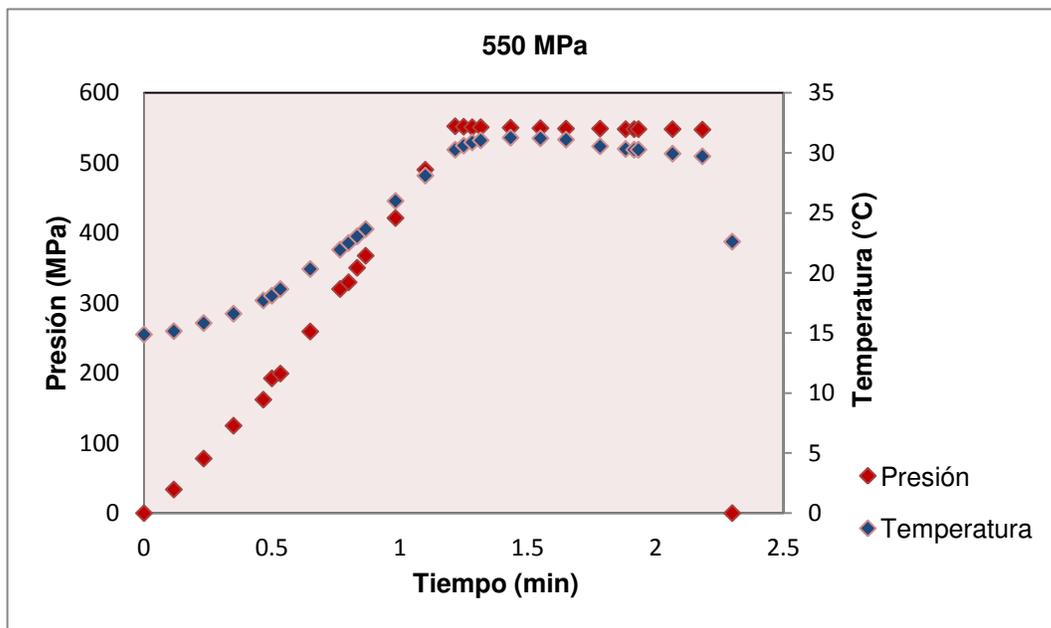
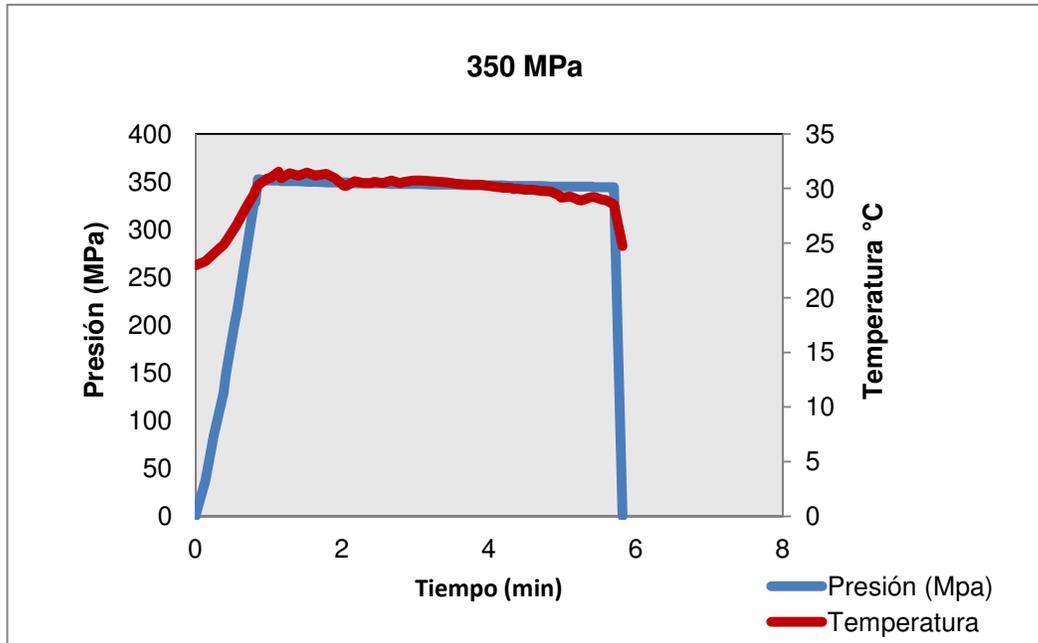
Las cinéticas de inactivación *L. innocua* muestran que a medida que la presión se incrementa la inactivación también lo hace, de tal forma que el comportamiento de inactivación en leche UHT no es el mismo al que se obtiene en la leche cruda.

Modelos no lineales como el de Gompertz muestra mejor ajuste a las cinéticas evaluadas que el modelo de Weibull.

La aplicación de las tecnologías no térmicas como la APH es factible en el caso de leche. Sin embargo, se espera el desarrollo de equipos más eficientes para disminuir costos y ésta tecnología sea más rentable logrando así una mayor aplicación en la industria de los alimentos.

ANEXOS

Se muestran dos perfiles de presión y temperatura que ejemplifican el proceso de APH aplicado a la leche.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Aciara, E., Allan, L., Kelly, Y., Patrick, M., Murphy, M., Thomas, B. 2001.** High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. *Trends in Food Science and Technology*.12: 351-359.
- Agustín, J., Jiménez, A., de Górgolas, M., Fernández, R., Fernández, M. 2001.** Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. *Enfermedades infecciosas microbiológicas*. 19: 297-303.
- Anema, S. 2010.** Effect of pH and pressure treatment on the acid gelation of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 265-273.
- Anonymous.2002.** Public Health Dispatch: Outbreak of listeriosis-Northeastern United States, 2002. *CDC-MMWR*. 51: 950-951.
- Arago G. M., Corradini, M. G., Normand, M. D., Peleg, M. 2007.** Evaluation of the weibull and long-normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non-isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 243-257.
- Aranceta, B., J., Majem, S. J. 2005.** Leche, Lácteos y Salud. Panamericana, España, Pág. 50.
- Asociación Española de Dietistas. 2010.** Revisión de Alimentos tratados por alta presión: Aspectos nutricionales. Elsevier Doyma. 14(2):53-58.
- Balci, A., Wilbey, R. A. 2002.** High pressure processing of milk- the first 100 years in the development of a new technology.*International Dairy Journal*. 52: 561-572.
- Barbosa, G. V., Bermúdez, D. 2010.** Procesamiento no térmico de alimentos. *Scientia Agropecuaria*. 1: 81-93.
- Belalcazar, M. E., Poutou, R., Torres, K. J., Gallegos, J.M. 2005.** *Listeria monocytogenes* y listeriosis animal. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*. 8(2): 95-101.
- Beltrán, J. A., Barbosa, G., Welti, J. 2011.** High hydrostatic pressure effect on *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in pear nectar.*Journal of Food Quality*. 34: 371-373.

- Bendicho**, S., Barbosa, G., Martín, O. **2002**. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology*. 13: 195-204.
- Bermúdez**, D., Mawson, R., Versteeg, K., Barbosa, G. **2008**. Composition parameters, physicochemical characteristics and shelf-life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. *Journal of Food Quality*. 32: 283-302.
- Bertelli**, S., Gomes, A., Lie, C., Gigante, M. **2008**. Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite. *Food Technology*. 11(4): 241-251.
- Boggs**, J. D., Whitwam, R.E., Hale, L.M., Briscoe, R.P., Kahn, S.E., MacCormack, J.N., Maillard, J.M, Grayson, S.C., Sigmon, K.S., Reardon, J.W., Saah, J.R. and EIS officers CDC. **2001**. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North. 286:664-665. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm> and in *J. Am. Med. Asso.* Consultado en agosto 2012.
- Bolado**, S., Góngora, M., Pothakamury, U., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. **2000**. A review of nonthermal technologies. *Trends in Food Engineering*. 10: 23-27.
- Bouaouina**, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J. **2006**. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high pressure treatment. *International Dairy Journal*. 16: 75-284.
- Bozoglu**, F., Alphas, H., Kaletung, C. **2004**. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 40: 243-247.
- Buchrieser**, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P. **2003**. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *Immunology and Medical Microbiology*. 35: 207-213.

- Buffa**, M. Guamis, B., Royo, C., Trujillo, A. J. **2001**. Microbial changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high pressure treated milk. *Food Microbiology*, Oxford. 18: 45-51.
- Buzrul**, S., Alpas, H., Largeteau, A., Demazeau, G. **2008**. Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *Food Res. Technol.* 227: 443-448.
- Buzrul**, Sencer., Alpas, Hami. **2006**. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiology*. 238: 29-36.
- Cano**, M., Begoña, A., Sánchez, C. **2005**. Altas presiones. Nueva alternativa para la mejora de la calidad y seguridad en vegetales frescos cortados. La Habana. Cuba. Pp.1-9.
- Carrascal**, C. A. K., Albarracín, C. Y., Sarmiento, T. P. **2007**. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expendida en el municipio de Pamplona, Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, Bistua*. 5:49-57.
- Carriedo**, G. **2003**. Mexican cheese may cause listeriosis. Newsrelease from the city of Laredo Health Department.<http://www.ci.laredo.tx.us/health/News/082003MexicanCheese/Mexican%20Cheese.htm>. Consultado el 27 agosto de 2010.
- CBC News**.**2008**. The cheese had to go, Quebec ministry says. September 11. <http://www.cbc.ca/consumer/story/2008/09/10/mtl-listeriosis0910.html>. Consultado en mayo de 2013.
- CDC**, **2005**. Center for Disease Control and Prevention. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*-New York City, 2001-2004. *Morb. Mortal.Wkly. Rep.* 54:605-608.
- CDC**, Centers of Disease Control and Prevention. **2008**. Listeriosis outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998-2008. 19(1).
- CFE**. Comisión Federa de Electricidad. Tarifas para servicios públicos **2012**. http://app.cfe.gob.mx/Aplicaciones/CCFE/Tarifas/Tarifas/tarifas_negocio.asp?Tarifa=CMAS&Anio=2012. Consultado en mayo de 2013.

- Cheftel**, J. C., Thiebaud, M., Dumay, E. **2002**. Pressure-assisted freezing and thawing of foods: A review of recent studies. *High Pressure* 22: 601-611.
- Chen**, H. **2006**. Use of linear, Weibull and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food science*. 3:21-27
- Chen**, H., Hoover D.G. **2003**. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 161-171.
- Chen**, H., Perchonok, M. **2008**. US Governmental Interagency Programs, Opportunities and Collaboration. *Food Science and Technology International*. 14: 447-453.
- Chen**, Haiqiang, Dallas, Hoover, G. D. **2002**. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4: 25-34.
- Cook**, D.W. **2003**. Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate-buffered saline and in oysters to high-pressure processing. *J. Food Prot.* 66: 2276-2282
- Corradini**, N. G., Normand, M. D., Peleg, M. **2005**. Calculating efficacy of heat sterilization process. *Journal of Food Engineering*. 67: 59-69.
- Cumming**, M., Kludt, P., Matyas, B, DeMaria, A., Stiles, T., Han, L., Gilchrist, M., Neves, P, Fitzgibbons, E. and Condon, S. **2008**. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy - Massachusetts, 2007. 57: 1097-1100.
- Dalgleish**, D.G., Spaquolo, P.A., Goff, D. **2005**. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emissions scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. 14: 1025-1031.
- Daoudi**, L. **2004**. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre zumo y gazpacho de uva. *Planta de Tecnología de Alimentos AUB*. Pp.14-20.
- Deet**, H., Khusniati, T., Datta, N., Wallace, R. B. **2002**. Spoilage patterns of skim and whole milks. *Journal of Dairy Research*. 69: 227-241.
- Delvotest** SP-NT. **2009**. Prueba para la determinación de sustancias antibacterianas en leche. Hoja técnica.

- Dogan, C., Erkmen, O. 2004b.** High pressure kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering*. 62: 47-52
- Donaghy, J. A., Linton, M., Patterson, M. F., Rowe, M. T. 2007.** Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avium* ssp. *partubaerculosis* in milk. *Food Microbiology Branch*. Pp. 154-159.
- Douglas G. 2004.** Physics: principles with applications. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Education. Tercera edición. Pp. 388-390.
- EFSA. 2007.** The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*, 130.
- EFSA. 2009.** The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 27 (1).
- Erkmen, O. 2009.** High hydrostatic pressure inactivation kinetics of *Salmonella typhimurium*. *High pressure research*. Taylor and Francis group. 29: 129-140.
- Erkmen, O., Dogan, C. 2004.** Effects of ultra high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* and natural flora in broth, milk and fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 91–97.
- Erkmen, O., Karatas, S. 1997.** Effect of High Hydrostatic Pressure on *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Food Engineering*. 33:257-262
- Estrada, M. J. A., Gutiérrez, J. A. 2011.** El libro blanco de la leche. CANILEC. 1: 23.
- FAO. 2006.** Leche y Productos Lácteos, Perspectivas Alimentarias y Análisis del Mercado. <http://www.fao.org/docrep/009/j7927s/j7927s09.htm>. Consultado en abril de 2013.
- FAO. 2012.** Leche y Productos Lácteos, Perspectivas Alimentarias y Análisis del Mercado Mundial. Consultado en abril de 2013.
- FDA, 2000.** Food and Drug Administration Center For Food Safety And Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing

- technologies. High Pressure Processing. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>. Consultado en Junio de 2012.
- FDA**, Food and Drug Administration. **2011**. Investigation operations manual. Exhibits 8-6. <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/IOM/ucm127372.htm>. Consultado en Octubre de 2012.
- Fernández**, J., Barbosa, G. V., Swanson, B. **2005**. Skim milk processing by combining pulsed electric fields and thermal treatments. *Journal of Food Processing and Preservation*. 29: 291-306.
- Fretz**, R., Sagel, U., Ruppitsch, W., Pietzka, A.T., Stöger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Pichler, J., Much, P., Pfaff, G., Stark, K, Prager, R., Flieger, A., Feenstra, O. and Allerberger, F. **2010**. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese “Quargel”, Austria and Germany 2009. *Euro. Surveill.*, 15: 19477.
- Gervilla**, R. **2001**. Estudio de los tratamientos por alta presión hidrostática en la leche de oveja. Tesis de la Universitat Autònoma de Barcelona. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Pp. 23-34.
- Guan**, D., Chen, H., Hoover, D. **2005**. Inactivation of *Salmonella typhimurium* DT 104 in UHT whole milk by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 145-153
- Guerrero**, B. J.A., Barbosa, C. G., Welti, C. J. **2011**. High hydrostatic pressure effect on *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in pear nectar. *Journal of Food Quality*. 34: 371-374.
- Guerrero**, J. A., Barbosa, C. G., Welti, C. J. **2011**. High hydrostatic pressure effect on natural microflora, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in navel orange juice. *International Journal of Food Engineering*. 7: Iss 1.
- Harris**, N.B., Payeur, J., Bravo, D., Osorio, R., Stuber, T., Farrel D., Paulson, D., Treviso, S., Mikolon, A., Rodriguez-Lainz, A., Cernek-Hoskins, S., Rast, R., Ginsberg, M., Kinde, H. **2007**. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating from Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1025-1028.

- Health Canada. 2010.** It's Your Health "Food Safety for Pregnant Women".
- Hernández, G. T., Peña, H. R., Velázquez, G., Ramírez, J. A., Torres, J.A. 2005.** Effect of combined thermal and high pressure processing on the microbial stability of milk during refrigerated storage. IFT Annual meeting. New Orleans. Louisiana, EUA.
- Herrero, A. M., Romero de Ávila, M. D. 2006.** Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. Revista Médica Universidad de Navarra. 50: 71-74.
- Houska, M., Strohalm, J., Kocurov, K., Totusek, J., Lefnerov, D., Trisaka, J. 2005.** High pressure and foods-fruit/vegetable juices. Journal of Food Engineering. 77: 386-398.
- Huppertz, T., Kelly, A., Fox, P. 2002.** Effects of high pressure on constituents and properties of milk. International Dairy Journal. 12: 561-572.
- Huppertz, T., Smiddy, M., Upadhyay, V., Kelly, A. 2006.** High-pressure changes induced changes in bovine milk: a review. International Journal of Dairy Technology. 59: 59-65.
- Llull P., Simal, S., Benedicto, J., Rosello, C. 2002.** Evaluation of textural properties of a meat-based product (sobrassada) using ultrasonic techniques. Journal of Food Engineering. 53: 279-285.
- Ludikhuyze, L., Clayes, W., Hendrickx, M. 2001.** Effect of temperature and/or pressure on lactoperoxidase activity in bovine milk and acid whey. Journal of Dairy Research. 68: 625-637.
- MacDonald. P.D.M., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., Saah, J.R., Graves, L.M., Hunter, S.B., Sobel, J. 2005.** Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. Clinical Infection Diseases. 40: 677-682.
- Madigan, M., Martinko, J. 2005.** Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall. Décimo primera edición. Pág.
- Mañas, P., Pagán, R. 2005.** Microbial inactivation by new technologies of food preservation. Journal of Applied Microbiology. 98: 1387-1399.

- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W. J., Jewell, K. 2004.** *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal Food Microbiology*. 92: 15-33.
- Mermelstein, N. H. 2001.** High-Temperature, short-time processing. *Food Technology*. 55(6): 65-66,68, 70,78.
- Miller, G. D.** The importance of milk and milk products in the diet. **2007.** *Handbook of dairy foods and nutrition*. Boca Raton FL: National Dairy Council. Pág. 32.
- Ministerio de Agricultura.** Dirección General de Competitividad Agraria, Perú. **2009.** Calidad de la leche. Pág. 1-15.
- NACMCF. 2006.** Requisitos científicos para establecimiento de los métodos alternativos a la pasteurización. *Journal of Food Protection*. 69: 1190-1216.
- Needs, E., Stenning, R., Gill, A., Ferragut, V., Rich, G. 2000.** High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research*. 67: 31-42.
- NMX-F-317-S-1982.** Determinación de pH en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Secretaría de Salud.
- NMX-F-387-1982.** Alimentos. Leche fluida determinación de grasa butírica por el método Gerber. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Secretaría de Salud.
- NMX-F-420-1982.** Productos alimenticios para uso humano. Determinación de acidez en leche fluida. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Secretaría de Salud.
- NOM-091-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud.
- NOM-092-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaría de Salud.
- NOM-113-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaría de Salud.

- NOM-114-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Secretaría de Salud.
- NOM-115-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphilococcus aureus* en alimentos. Secretaría de Salud.
- NOM-143-SSA1-1995.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Secretaría de Salud.
- NOM-243-SSA1-2010.** Productos y Servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
- Pagan, R., Mackey, B. 2008.** Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary phase cells and variation among strains. Applied and Environmental Microbiology.66: 2829- 2834.
- Pagotto, F., Clark, C., Farber, J. and the Canadian Public Health Laboratory Network. 2006.** Canadian Listeriosis Reference Service. Foodborne Pathog. 3: 132-137.
- Palmieri, L., Cacace, D. 2005.** High Intensity Pulsed Light Technology. Emerging technologies for food processing. London. Elsevier. pp. 279-306.
- Patazca, E., Koutchma, T., Balasubramaniam, V. M. 2007.**Quasi-adiabatic temperautre increase during high pressure processing of select foods.Journal of Food Engineering. 80: 199-205
- Patterson, M. F., Kilpatrik, D. J. 1998.** The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens and milk and poultry. . Food Prot. 61: 432-436
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson. R., Gilmour, A. 1995.** Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. J. Food Protection. 58:524-529
- Patterson, M., Donaghy, J., Linton, M., Rowe, M. 2007.** Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avius* ssp. *paratuberculosis* in milk.Food Microbiology. 45:154-159.

- Patterson**, M., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A. **2005**. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*. 58: 524-525.
- Peleg**, M., Cole, M. B. **1998**. Reinterpretation of microbial survival curves. *Food Science*. 38: 353-380.
- Norma de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.** **2011**. Canadá.
- Ponce**, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mo-Mur, M. **1999**. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology*. 16: 357-365
- Prescott**, Lansing, M., Jhon, Harley, P., Klein, D. **2000**. *Microbiología Interamericana*. Cuarta edición. Pág. 59.
- Rademacher**, B., Hinrichs, J. **2006**. Effects of high pressure on indigenous enzymes in bovine milk: reaction kinetics, inactivation and potential application. *International Dairy Journal*. 16: 655-661.
- Ramírez**, R. C., Rosas, U. P., Velázquez, M., Arce, M. F. **2011**. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*. 7: 1-16.
- Reventos**, S. M. **2003**. *Industria alimentaria, tecnologías emergentes*. Ediciones UPC. Barcelona, España.
- Rivalain**, N., Roquain, J., Demazeau, G. **2010**. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnology. *Biotechnology Advances*. 28: 659-672.
- SAF**. Secretaria de Fomento Agropecuario. SAGARPA. **2011**. *Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011-2020*.
- SAGARPA**. **2010**. Boletín de leche bovino. Consultado en octubre de 2012.
- SAGARPA**. **2011**. Boletín de leche bovino. Consultado en febrero de 2013.
- Saldo**, J., Suárez, A., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X. **2009**. Use of ultra high pressure homogenization to preserve apple juice without heat damage. *High pressure research*. 29: 52-60.

- Saldo**, P. J., Buenaventura, G. L., Sendra, N.E. **2002**. Cambios en las características de un queso de leche de cabra sometido a alta presión hidrostática. Aceleración de la maduración. Tesis de la Universitat Autònoma de Barcelona. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Pág.: 22.
- San Martín**, M. F., Rodríguez, J., Gurram, S., Clark, S., Swanson, B. G., Barbosa, G. V. **2002**. Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *Food Science and Technology*. 40: 697-705.
- Sánchez**, M., De Ancos, B., Plaza, L., Elez, P., Cano, M. **2009**. Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49: 552-576.
- Schobitz**, R., Marín, M., Horzella, M., Carrasco, E. **2001**. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro Sur*. 2:29-34.
- SESEQ**, **2011**. Programa Tuberculosis. Secretaría de Salud del Estado de Querétaro. <http://www.sesa-gro.gob.mx>. Consultado en septiembre de 2012
- Shimada**, S., Andou, M., Natio, N., Yamada, N., Osumi, M., Hayashi, R. **1993**. Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40: 123-131.
- SIAP**. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA. 2011. Producción Nacional Pecuaria en 2011. http://www.canilec.org.mx/prod_leche.html. Consultado en mayo de 2013.
- Smelt**, J. P., Hellemons, J. C., Patterson, M. **2002**. Effects of high pressure on vegetative microorganisms. In: Hendrickx, M. y Knorr, D. Ultra high pressure treatments of foods. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, pp: 55-76.

- TADF, 2009.** Transmissible Animal Diseases Forum: http://tafsforum.org/position_papers/TAFS_POSITION_PAPER_MILK_2009_FEB. Consultado en febrero de 2013.
- Tay, A., Shellhammer, T.H., Yousef, A.E., Chism, G. W. 2003.** Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal Food Protection*. 66: 2057-2061.
- Téllez, L., Ramirez, J., Pérez, C., Vázquez, M., Simal, J. 2001.** Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 3: 63-80.
- Tholozan, J. L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M. & Tissier, J.P. 2000.** Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 202-212.
- Tholozan, J.L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M., Tissier, J.P. 2000.** Physiological effect of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 202-212
- Tiwari, B., O'Donnell, C., Cullen, P. 2009.** Effect of nonthermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*. 20: 137-145.
- Tonello, C. 2010.** Alimentos tratados por alta presión, comercializados en el mundo en el 2009 en el sector alimentario. Comunicación personal.
- Trespacios, M.P. 2007.** Gelificación de productos avícolas por alta presión isostática: Actividad sinérgica de la transglutaminasa microbiana. Tesis de la Universitat Autònoma de Barcelona. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Págs.: 28-48.
- Ulmer, H. M., Gaenzle, M. G., Vogel, R. F. 2000.** Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus platarum* TW1-460. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 3966-3973.
- Vargas, M. J. 2006.** Utilización de la Leche Concentrada Descremada Reconstituida para la Elaboración de Leche UHT: Efecto físico, químico y

- estabilidad. Tesis de la Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Pp. 8-12. Universidad Complutense de Madrid. España. Pp. 38-42.
- Velázquez, G., Vázquez, P., Vázquez, M., Torres, J. A. 2005.** Aplicaciones del procesado de alimentos por alta presión. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 4:343-352.
- Villamiel, M. 2006.** Tratamiento de alimentos con microondas. Tesis de la Universidad Complutense de Madrid. España. Pp. 38-42.
- Wattiaux, M.A. 2005.** Composición de la leche y valor nutricional. Agriculture Hall. Universidad de Wisconsin, Instituto de Babcock. 240: 73-76
- Wuytack, E., Diels, M. J., Michiels, C. 2002.** Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. International Journal of Food Microbiology. 77: 205-212.
- Yuste, J., Capellas, M., Pla, R., Fung D.Y.C., Mor-Mur, M. 2001.** High pressure processing for food safety and preservation: a review. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. 9: 1-10