

Universidad Complutense de Madrid
 Facultad de Farmacia
 Departamento de Nutrición y Bromatología II

**CALENTAMIENTO DE LECHE CON MICROONDAS.
 ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES INDICADORES DE TRATAMIENTO
 TÉRMICO.**

Patrona: Sr. D^a M^a Esperanza Torija Jaso

TRIBUNAL
 Presidente: Sr. Dr. Laura Coll Hellín
 Vocal: Sr. Dr. Fco. Javier Lopez Andreu
 Vocal: Sr. Dr. Manuel Suarez Iglesias
 Vocal: Sr. Dr. Mercedes Ramos Gonzalez
 Secretario: Sr. Dr. M^a Teresa Orzáez Villanueva

M^a del Mar Villamiel Guerra

Madrid, 1995

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología II

**CALENTAMIENTO DE LECHE CON MICROONDAS.
ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES INDICADORES DE TRATAMIENTO
TÉRMICO.**

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Farmacia
presenta
M^a del Mar Villamiel Guerra
Instituto de Fermentaciones Industriales
C.S.I.C.
Madrid, 1995



AGUSTIN OLANO VILLEN, Dr. EN CIENCIAS QUIMICAS, PROFESOR DE INVESTIGACION DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C. Y, NIEVES CORZO SANCHEZ, Dra. EN FARMACIA, COLABORADOR CIENTIFICO DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado "Calentamiento de leche con microondas. Estudio de los principales indicadores de tratamiento térmico", y que constituye la memoria que presenta D^a M^a del Mar Villamiel Guerra para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Tecnologías Sectoriales bajo nuestra dirección.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Madrid a nueve de Octubre de mil novecientos noventa y cinco

Nieves Corzo Sánchez

Agustín Olano Villén

A mis padres

A Jose

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de los doctores Agustín Olano Villén, Profesor de Investigación del C.S.I.C. y Nieves Corzo Sánchez, Colaborador Científico del C.S.I.C., a quienes agradezco no sólo su gran apoyo y confianza depositada en mí durante todos estos años, sino además los consejos que han servido para orientar mi vida profesional.

Me gustaría, también, expresar mi agradecimiento:

A la Dra. Esperanza Torija Isasa, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis.

A la Dra. Carmen Polo Sánchez, Directora del Instituto de Fermentaciones Industriales, por las facilidades con las que he contado para la realización del presente trabajo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de una beca de Formación del Personal Investigador, lo que posibilitó el llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

A los doctores Isabel Martínez Castro y Guillermo Santa-María Blanco, Investigadores Científicos del C.S.I.C., por su asesoramiento durante algunas fases de este trabajo.

A la Dra. Rosina López Fandiño, Colaborador Científico del C.S.I.C., por su inestimable colaboración en la realización de parte del presente trabajo, así como por todos los conocimientos que ha compartido conmigo y el interés y simpatía demostrados.

A mis compañeros Mayte, Teresa, Espe, Julián, Pedro, M^a Carmen, Marta, Toñi, Elena, Loli, Daniel, Conchi y Cristina, por todo lo que me han enseñado, por apoyarme en los momentos difíciles y haber compartido conmigo buenos momentos. También, a M^a José Rodríguez me gustaría agradecer su colaboración en algunas determinaciones analíticas.

A todo el personal del Instituto de Fermentaciones Industriales por la ayuda y amabilidad con las que he contado durante todo este tiempo.

Quisiera agradecer a mi familia, pero muy especialmente a mis padres, por haberme enseñado tantas cosas y por su apoyo y confianza incondicionales en todos los momentos de mi vida. También, quisiera agradecer, con mucho cariño, a Jose, su apoyo, confianza y paciencia, pero sobre todo, el haber compartido conmigo tantos años durante los que me ha demostrado lo importante que es luchar por las cosas que merecen la pena. De alguna forma ellos han colaborado también en la realización del presente trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. TRATAMIENTOS TERMICOS CONVENCIONALES	1
1.2. TRATAMIENTOS DE CONSERVACION ALTERNATIVOS	3
1.2.1. Calentamiento óhmico	3
1.2.2. Tratamiento mediante pulsos eléctricos de alto voltaje	4
1.2.3. Irradiación infrarroja	5
1.2.4. Irradiación ultravioleta	5
1.2.5. Irradiación gamma	6
1.2.6. Tratamiento por extrusión	7
1.2.7. Tratamiento a alta presión	8
1.2.8. Tratamiento mediante ultrasonidos	9
1.3. TRATAMIENTO TERMICO POR MICROONDAS	10
1.3.1. Factores más importantes que inciden en el calentamiento	14
1.3.1.1. Diseño del equipo	14
1.3.1.2. Composición y propiedades físicas del alimento	16
1.3.1.3. Tamaño y forma del alimento	17
1.3.2. Tratamiento térmico de leche mediante microondas	18
1.3.2.1. Pasterización y esterilización	18
1.3.2.2. Deshidratación	24
1.4. EVALUACION DE LA INTENSIDAD DE LOS PROCESOS TERMICOS APLICADOS A LA LECHE	25
1.4.1. Lactulosa	27
1.4.2. Furosina	30
1.4.3. Relación lactulosa/furosina	32
1.4.4. β -lactoglobulina sin desnaturalizar	33

1.4.5. Fosfatasa alcalina	35
1.4.6. Lactoperoxidasa	37
1.4.7. Límites propuestos por la FIL y por la UE para los principales indicadores térmicos	38
1.5. EVALUACION DEL PERIODO DE VIDA UTIL DE LA LECHE	
PROCESADA	39
1.5.1. Análisis sensorial	39
1.5.2. Control microbiológico	40
1.5.3. Actividad proteolítica y proteolisis de las caseínas	41
OBJETIVOS	43
PLAN DE TRABAJO	44
2. MATERIALES Y METODOS	45
2.1. MUESTRAS	45
2.1.1. Preparación de muestras	46
2.1.1.1. Disolución de lactosa en tampón fosfato	46
2.1.1.2. Desnatado de la leche	46
2.1.1.3. Ultrafiltración	46
2.1.1.4. Homogeneización	46
2.1.1.5. Envasado aséptico	47
2.2. TRATAMIENTOS TERMICOS	47
2.2.1. Tratamientos en discontinuo	47
2.2.1.1. Horno microondas	47
2.2.1.1.1. Comprobación de la potencia del magnetrón	53
2.2.1.1.2. Calibración de la sonda de temperatura	53
2.2.1.1.3. Condiciones de calentamiento	53
2.2.1.2. Baño termostatzado	54

2.2.2. Tratamientos en flujo continuo	54
2.2.2.1. Horno microondas	54
2.2.2.1.1. Condiciones de calentamiento	59
2.2.2.2. Pasterizador de placas intercambiadoras de calor	59
2.2.2.2.1. Condiciones de calentamiento	62
2.2.2.3. Pasterizador tubular	62
2.2.2.3.1. Condiciones de calentamiento	64
2.3. CONSERVACIÓN	64
2.4. METODOS ANALITICOS	64
2.4.1. Determinación de lactulosa y epilactosa por cromatografía de gases	65
2.4.2. Determinación de proteínas de suero no desnaturalizadas mediante HPLC	65
2.4.3. Determinación de la furosina mediante HPLC	67
2.4.4. Prueba de la fosfatasa alcalina	68
2.4.5. Prueba de la lactoperoxidasa	68
2.4.6. Recuento de bacterias totales	69
2.4.7. Grado de proteólisis	69
2.4.8. Análisis sensorial	70
2.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS	72
3. RESULTADOS Y DISCUSION	73
3.1. TRATAMIENTOS EN DISCONTINUO	73
3.1.1. Puesta a punto del equipo	73
3.1.2. Gradiente de temperatura en el interior de la muestra	83
3.1.3. Influencia de los componentes lácteos mayoritarios en el calentamiento de la leche por microondas	96

3.1.4. Comparación de calentamientos de leche por microondas y convencionales	101
3.1.4.1. Desnaturalización de las proteínas de suero	101
3.1.4.2. Isomerización de la lactosa y reacción de Maillard	104
3.1.4.3. Comparación de la precisión de los calentamientos con microondas y convencionales	108
3.2. TRATAMIENTOS EN FLUJO CONTINUO	111
3.2.1. Puesta a punto del equipo microondas	111
3.2.2. Calentamiento de leche de vaca y de cabra mediante microondas	117
3.2.2.1. Ensayos con tubo de 2 m	117
3.2.2.1.1. Tratamientos térmicos	117
3.2.2.1.2. Inactivación de la fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa	117
3.2.2.1.3. Recuento de bacterias totales	119
3.2.2.1.4. Desnaturalización de las proteínas de suero	120
3.2.2.2. Ensayos con tubo de 1,25 m	122
3.2.2.2.1. Tratamientos térmicos	122
3.2.2.2.2. Inactivación de la fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa	124
3.2.2.2.3. Recuento de bacterias totales	124
3.2.2.2.4. Desnaturalización de las proteínas de suero	125
3.2.2.2.5. Conservación de leche de vaca y cabra procesadas térmicamente	127
3.2.2.2.5.1. Evaluación de la vida útil mediante índices microbiológicos	128
3.2.2.2.5.2. Evaluación de la vida útil mediante el estudio del grado de proteolisis	130
3.2.3. Pasterización en flujo continuo mediante microondas y en pasterizador de placas	134

3.2.3.1. Pasterización de leche de vaca	134
3.2.3.1.1. Pasterización con microondas	134
3.2.3.1.1.1. Inactivación de la fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa	136
3.2.3.1.1.2. Desnaturalización de β -lactoglobulina	136
3.2.3.1.2. Pasterización con un pasterizador de placas	137
3.2.3.1.2.1. Inactivación de la fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa	139
3.2.3.1.2.2. Desnaturalización de β -lactoglobulina	139
3.2.3.1.3. Conservación de leche pasterizada con microondas y con pasterizador de placas	142
3.2.3.2. Pasterización de leche de cabra	146
3.2.3.2.1. Pasterización con microondas y con pasterizador de placa	146
3.2.3.2.1.1. Inactivación de la lactoperoxidasa	148
3.2.3.2.1.2. Recuento de bacterias totales	148
3.2.3.2.1.3. Desnaturalización de la β -lactoglobulina	148
3.2.4. Comparación de tratamientos de pasterización con microondas y con pasterizador tubular	150
3.2.4.1. Inactivación de la fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa	150
3.2.4.2. Desnaturalización de la β -lactoglobulina	152
4. CONCLUSIONES	154
5. BIBLIOGRAFIA	156

SIGLAS ENCONTRADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

ABTS: Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

BSA: Seroalbúmina bovina.

DSR: Desviación estándar relativa.

FIL: Federación Internacianal de Lechería.

HMF: Hidroximetil furfural.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

HTST: Tratamientos térmicos a alta temperatura y cortos tiempos.

IR: Infrarrojo.

LTLT: Tratamientos térmicos a baja temperatura y largos tiempos.

PVC: Cloruro de polivinilo.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

TCA: Acido tricloroacético.

TNBS: Acido trinitrobenceno sulfónico.

TMS: Trimetil silil.

UE: Unión Europea.

UHT: Tratamientos térmicos a ultraalta temperatura.

UV: Ultravioleta.

I. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La leche es un medio muy adecuado para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, algunos provenientes del mamífero productor y otros debidos a la contaminación durante la manipulación de la leche cruda. Por ello, este alimento no es apto para el consumo sin un tratamiento previo de higienización.

A lo largo de los años, se han desarrollado diferentes procesos tecnológicos con el objeto de obtener un producto adecuado para el consumo desde el punto de vista microbiológico y con el mínimo deterioro de sus características nutricionales y organolépticas.

1.1. TRATAMIENTOS TERMICOS CONVENCIONALES

Desde los primeros procedimientos de pasteurización de leche mediante el calentamiento a 62-65°C durante 30 minutos, la industria láctea ha introducido una serie de procesos basados en la aplicación de calor a la leche cruda, tal y como se resume en la tabla 1.

De este modo se consigue no sólo higienizar la leche cruda sino que también se prolonga el período de vida útil desde varios días a 6 meses dependiendo del proceso aplicado. En términos generales, una mayor intensidad del tratamiento térmico permite un período de vida útil más largo pero a la vez ocasiona un deterioro superior de los constituyentes de la leche con detrimento de la calidad nutricional y organoléptica de la misma. Por ello, a pesar del considerable desarrollo de los procesos disponibles, la industria continúa estudiando nuevos diseños de equipos para una mejor eficacia en la transmisión de calor en los intercambiadores (Pasteurización, UHT indirecto) o en la infusión del vapor de agua (UHT directo), así como en el desarrollo de procesos alternativos a los tradicionales.

Tabla 1. Principales tratamientos térmicos aplicados actualmente en la industria láctea.

<i>PROCESO</i>	<i>TEMPERATURA(°C)</i>	<i>TIEMPO</i>	<i>OBJETIVO</i>
<i>Termización</i>	62-65	15-20 s	Destrucción de psicrotrofos
<i>Pasterización</i>	En discontinuo	63 (baja)	30 min
	En continuo	71-75 (alta)	15-40 s
	(HTST)	85-90 (ultra-alta)	2-10 s
<i>UHT</i> (directo e indirecto)	135-150	2-10 s	Destrucción de todos los microorganismos
<i>Esterilización clásica</i>	110-120	20-40 min	Destrucción de todos los microorganismos(formas vegetativas, esporuladas y enzimas termorresistentes).

1.2. TRATAMIENTOS DE CONSERVACION ALTERNATIVOS

El interés, tanto del consumidor como de la industria, de disponer de alimentos procesados con características cada vez más similares a las de los productos frescos, ha motivado durante las últimas décadas numerosos estudios sobre procesos que mejoren las propiedades de los productos obtenidos por tratamientos convencionales. La mayor parte de ellos se conocen desde hace bastantes años, sin embargo, actualmente existe un renovado interés en el desarrollo de productos mínimamente tratados.

1.2.1. Calentamiento óhmico

Este método consiste someter al alimento a la acción de una corriente eléctrica alternante con una frecuencia aproximada de 50 Hz, originando un aumento de temperatura. El calentamiento óhmico ha sido desarrollado para el tratamiento de productos en continuo (Qihua y col., 1994), siendo especialmente útil en el caso de alimentos particulados (Alwis y Fryer, 1992; Parrot, 1992; Sastry, 1992; Fryer y Zhang, 1993) debido a que presenta una considerable capacidad de penetración, por lo que se evitan sobrecalentamientos en las superficies (Skudder, 1988; Anónimo, 1992). El efecto del calentamiento depende por una parte de la conductividad eléctrica del producto y por otra del tiempo de residencia en el sistema calefactor (Skudder, 1989). Valores bajos de conductividad eléctrica en las partículas pueden provocar calentamientos excesivos en las zonas donde éstas se encuentren (Sastry, 1992).

Este tipo de calentamiento además de ser adecuado para el tratamiento de alimentos particulados, también presenta una serie de ventajas tales como ser de fácil limpieza, manejo y mantenimiento de los equipos (Skudder, 1988).

En el caso de productos lácteos se ha utilizado para procesar salsas de queso

y derivados lácteos dulces, sin embargo no se dispone de datos a escala industrial ya que la mayor parte de los ensayos se han realizado en planta piloto (Skudder, 1989).

1.2.2. Tratamiento mediante pulsos eléctricos de alto voltaje

Este proceso se lleva a cabo mediante la aplicación a temperatura ambiente de pulsos eléctricos intensos sobre un alimento durante tiempos cortos (del orden de μ segundos). El proceso puede tener lugar en cámaras estáticas o bien en flujo continuo. La efectividad del tratamiento en cuanto a inactivación microbiana se refiere, depende del campo eléctrico, del tiempo de tratamiento y de la naturaleza de los microorganismos. Una de las principales ventajas de este proceso es que no altera la calidad físico-química del alimento (Martín y col., 1994). En cuanto a los inconvenientes, cabe destacar la incapacidad de inactivar las formas esporuladas de los microorganismos mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje (Knorr y col., 1994).

La aplicación de campos eléctricos en alimentos se conoce desde principios de siglo, ya que, Fetterman (1928), usó la conductividad eléctrica para inactivar el bacilo tuberculoso y *Escherichia coli* en leche. Getchell (1935) pasterizó este alimento mediante el paso de una corriente alterna a 220 V. Moses (1938) estimó que, entre 1928 y 1938, al menos 200 millones de litros de leche se consumieron pasterizados eléctricamente sin efectos perjudiciales para los consumidores. Sin embargo, este sistema de pasterización dejó de utilizarse sin motivo aparente (Hall y Trout, 1968; Palaniappan y col., 1990). Bach (1975) patentó un sistema de pasterización para productos lácteos semisólidos, alimentos ricos en grasa y bebidas, por aplicación de alta frecuencia y campos electromagnéticos (Anónimo, 1980). Este tipo de tratamiento también se ha utilizado a nivel industrial para alimentos sólidos tales como carne y pescados (Mertens y Knorr, 1992).

1.2.3. Irradiación infrarroja

Consiste en someter al alimento a la acción de radiaciones infrarrojas. Dichas radiaciones se encuentran en el espectro electromagnético en la zona intermedia entre las microondas y las radiaciones ultravioleta y se generan mediante calentamiento eléctrico inducido de compuestos metálicos especiales. Cuando actúan sobre el sustrato se produce un mayor calentamiento en la superficie que en el interior del mismo (Kessler, 1988; Sakai y col., 1993).

Se han llevado a cabo proyectos para intentar aplicar este tipo de tratamiento a productos granulados y viscosos, tal y como se describe en la patente de Kau y Lars (1991). Algunos autores han considerado que las radiaciones infrarrojas pueden aplicarse a leche, siendo un sustrato particularmente sensible a la acción de las mismas (Gallmann y Eberhard, 1992).

1.2.4. Irradiación ultravioleta

Consiste en someter al alimento a la acción de radiaciones ultravioleta, las cuales poseen una longitud de onda comprendida entre 100 y 280 nm y son generadas por lámparas de vapor de mercurio. No penetran profundamente en el interior del producto irradiado, pero poseen un importante poder germicida por lo que este tipo de tratamiento es fácilmente aplicable en la desinfección de equipos e instalaciones (Kessler, 1988).

En la década de los 50 se llevaron a cabo ensayos de esterilización de leche mediante radiaciones ultravioleta (Burton, 1951). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que el efecto germicida no fue el esperado, además de verse alterada la calidad sensorial de la leche de forma notable (Stucki, 1951). En 1976, Munkacsi y Elhami estudiaron el efecto de la irradiación ultravioleta a diferentes tiempos sobre algunos parámetros químicos y microbiológicos de la leche. Estos

autores concluyeron que alrededor del 93% de los microorganismos totales y el 99,5% de los coliformes, se destruían mediante dichas radiaciones cuando éstas actuaban durante 20 segundos. También comprobaron que el tiempo de coagulación de la leche disminuía y que se originaba un ligero sabor a cocido.

En 1981, Filipov utilizó la radiación ultravioleta para destruir los microorganismos de la leche y en todas las muestras analizadas el número de bacterias disminuía conforme aumentaba el tiempo de exposición a la radiación.

En estudios posteriores se realizaron tratamientos de leche que contenía aflatoxinas con radiaciones ultravioleta, comprobando que este tratamiento tiene un efecto descontaminante (Yousef y Marth, 1986).

1.2.5. Irradiación gamma

Los rayos gamma son otro tipo de radiaciones electromagnéticas y se encuentran en la zona de alta frecuencia del espectro. Se generan a partir de isótopos radiactivos tales como cobalto 60 y cesio 137.

Este tipo de radiación se ha estado utilizando para el tratamiento de alimentos desde 1949 (Burton, 1949). La destrucción de gérmenes que garantiza una adecuada calidad sin riesgos para la salud, normalmente precisa de altas dosis de irradiación y como consecuencia de ello se pueden ver alteradas las características sensoriales del alimento.

El tipo de alimento influye decisivamente en la dosis de radiación, así por ejemplo el tratamiento de queso Mozzarella y Cheddar requiere mayor dosis de rayos gamma que la que se precisa en el caso de helados de nata (Hashisaka y col., 1990 a y b). En leche y productos lácteos, cuando la dosis de radiación no está controlada, la formación de radicales libres durante el tratamiento acelera la oxidación de la

grasa láctea incidiendo de forma negativa en las propiedades organolépticas (Sadoun y col., 1991).

En Egipto y Francia se ha utilizado la irradiación gamma en la esterilización de leche que se emplea para la elaboración de quesos propios de la zona, comprobándose un incremento en la vida útil de los mismos (Abdel Baky y col., 1986; Starck, 1989).

1.2.6. Tratamiento por extrusión

Es un tratamiento térmico a alta temperatura (150-220°C) y alta presión (100-200 bares), en un corto espacio de tiempo (10-200 segundos) durante el cual, el calentamiento se combina con procesos mecánicos (Kessler, 1988). El tratamiento tiene lugar en el interior de una cavidad provista de orificios en las paredes a través de los cuales se hace pasar vapor de agua para que el alimento adquiriera una nueva textura. El movimiento del sustrato dentro de la cavidad tiene lugar gracias al giro de uno o varios tornillos sin fin que existen en el interior del extrusor. Finalmente se produce una despresurización del sistema, así como la evaporación del agua añadida. La presión en el orificio de salida, el contenido en agua y la composición del producto influyen en la estructura final del mismo (Cheftel, 1990; Gallmann y Eberhard, 1992).

La extrusión se aplica fundamentalmente a alimentos sólidos y en polvo. Este tratamiento se emplea en las industrias de cereales destinados a desayunos, galletas, pasta, fórmulas infantiles, etc. (Gallmann y Eberhard, 1992).

En suero de leche en polvo se ha aplicado este tratamiento con el fin de destruir *Staphylococcus thermophilus*, comprobándose que no se afectaban las propiedades funcionales de las seroproteínas (Quéguiner y col., 1989).

1.2.7. Tratamiento a alta presión

Consiste en someter el alimento a presiones comprendidas entre 1000 y 10000 bares lo que puede afectar a diversos componentes y sistemas biológicos. La duración de este tratamiento es independiente del volumen o de la masa de material, sin ser necesario aplicar energía suplementaria para mantener las condiciones un tiempo prolongado (Cheftel, 1991). La fricción de las moléculas incrementa la temperatura 2-2.5°C por cada 100 bares.

El tratamiento por alta presión se utiliza para la estabilización de mezclas de alimentos líquidos, así como para la extracción de proteínas celulares a partir de microorganismos, siendo las paredes de las bacterias Gram-negativas las más susceptibles a este tipo de tratamiento (Büschelberger, 1986).

Se ha comprobado que las esporas no sólo no se destruyen con este tipo de tratamiento, sino que además favorece su germinación, por lo que es necesario combinarlo con un tratamiento térmico simultáneo para asegurar la total eliminación de microorganismos en un alimento (Popper y Knorr, 1990).

Según Cuyás y col. (1994) este tratamiento en la industria alimentaria no supone de momento una alternativa global a los procesos convencionales por calor, si bien, consideran que puede resultar adecuado para carne, pescado, huevos, chocolate, mermelada, paté, etc., produciendo alteraciones mínimas en las características sensoriales del alimento, sin embargo, difícilmente puede sustituir, a tratamientos UHT de alimentos líquidos.

Al tratar leche con altas presiones se observa una disminución en su blancura debido probablemente a cambios conformacionales en las caseínas (Shibauchi y col., 1992). Cheftel (1992) postuló que el efecto de altas presiones sobre las proteínas de suero se traduce en una desnaturalización de las mismas. Se ha comprobado también

que el gel originado por coagulación ácida a partir de leche sometida a altas presiones presenta una mayor rigidez, aumentando la fuerza de rotura frente a los geles control (Johnston y col., 1993). Desobry-Banon y col. (1994) realizaron un estudio de los cambios fisicoquímicos originados en la leche al someterla a presiones de hasta 7000 bares. Comprobaron que a presiones por debajo de 2300 bares la estructura micelar se solubiliza ligeramente y tanto las propiedades ópticas como reológicas de la leche no se ven afectadas de forma importante. Por el contrario, la aptitud a la coagulación se modifica en gran medida a presiones en torno a 2000 bares. Por encima de 2300 bares se produce un importante reordenamiento y compresión de las caseínas, lo cual modifica las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la leche.

1.2.8. Tratamiento mediante ultrasonidos

El efecto de las ondas ultrasónicas sobre las bacterias se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos (Kinsloe y col., 1954; Dalzell y col., 1957; Davies, 1959; Boucher, 1979; Scherba y col., 1991). Cuando ondas de 35-40 KHz de frecuencia actúan sobre los microorganismos se produce la ruptura de sus paredes celulares y como consecuencia la muerte celular. En 1966, Pisano y col., propusieron el tratamiento de alimentos con ultrasonidos como método de esterilización, sin embargo, este tipo de tecnología no se desarrolló ampliamente en la industria de alimentos.

Desde hace unos años se está utilizando la termoultrasonificación, es decir el efecto combinado de las ondas ultrasónicas con el calor. Así, Ordóñez y col. (1987) compararon los efectos, conjuntamente y por separado, del calor y de los ultrasonidos sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en tampón fosfato y leche UHT entera. Comprobaron una mayor reducción en el número de microorganismos cuando se sometían las muestras a la termoultrasonificación que cuando se aplicaban los tratamientos por separado. García y col. (1989) comprobaron

con éxito la aplicación de la termoultrasonificación en procesos de esterilización de leche para reducir la intensidad del tratamiento térmico. Posteriormente, Wrigley y Llorca (1992) realizaron este tipo de tratamientos sobre leche desnatada inoculada con *Salmonella typhimurium* y pusieron de manifiesto que la termoultrasonificación produce la destrucción de dichas bacterias.

También se puede combinar la termoultrasonificación con tratamientos a presión, así, López y col. (1994) realizaron un estudio sobre inactivación de peroxidasa, lipooxigenasa y polifenoloxidasas mediante manotermoultrasonificación y comprobaron que estos tratamientos combinados podrían ayudar a solventar los problemas derivados de la termoestabilidad de los enzimas de la leche, zumos y otras bebidas.

1.3. TRATAMIENTO TÉRMICO POR MICROONDAS

El tratamiento térmico de alimentos mediante microondas es un proceso alternativo a los procedimientos tradicionales que se conoce desde finales de 1940 siendo en los últimos 20 años cuando mayor auge ha alcanzado. Esto es debido fundamentalmente, a las ventajas que presenta frente a los tratamientos convencionales en cuanto a velocidad, limpieza, calentamiento selectivo del alimento, reducción de costes, mejora de la calidad y ahorro de energía (Decareau, 1985; Ohlsson, 1991).

Las microondas son parte del espectro electromagnético en el rango de frecuencia, entre las zonas del infrarrojo y las ondas de radio y corresponden a longitudes de onda comprendidas entre 1 m y 1 mm (300 MHz-300 GHz de frecuencia, respectivamente) (Decareau, 1985). Debido a la proximidad existente entre las bandas de las microondas y de las ondas de radio, pueden solaparse las primeras en la zona de las ondas del radar. Con objeto de no interferir con estos usos, los microondas domésticos e industriales operan a unas frecuencias de 2450

y 915 MHz, siendo la primera más utilizada en Europa y Estados Unidos y la segunda en el Reino Unido (Mingos y Baghurst, 1991; Schlegel, 1992).

Las microondas se generan en el magnetrón, dispositivo que transforma la energía eléctrica en un campo electromagnético, y cambian los centros de carga positiva y negativa varios billones de veces por segundo. Cuando las microondas se aplican a materiales dieléctricos, tales como los alimentos, las moléculas dipolares se orientan con el campo y al ser éste alternante, da lugar a una fricción entre las moléculas polares que causa un aumento de la temperatura. Otro mecanismo que contribuye al calentamiento es el debido a la frecuencia de la colisión entre los iones de las moléculas ionizables que también se desplazan con la orientación del campo (Gallmann y Eberhard, 1992; Giese, 1992) (figura 1). Una vez que se genera el calor se transmite por mecanismos de conducción y convección térmica (Mudgett, 1989).

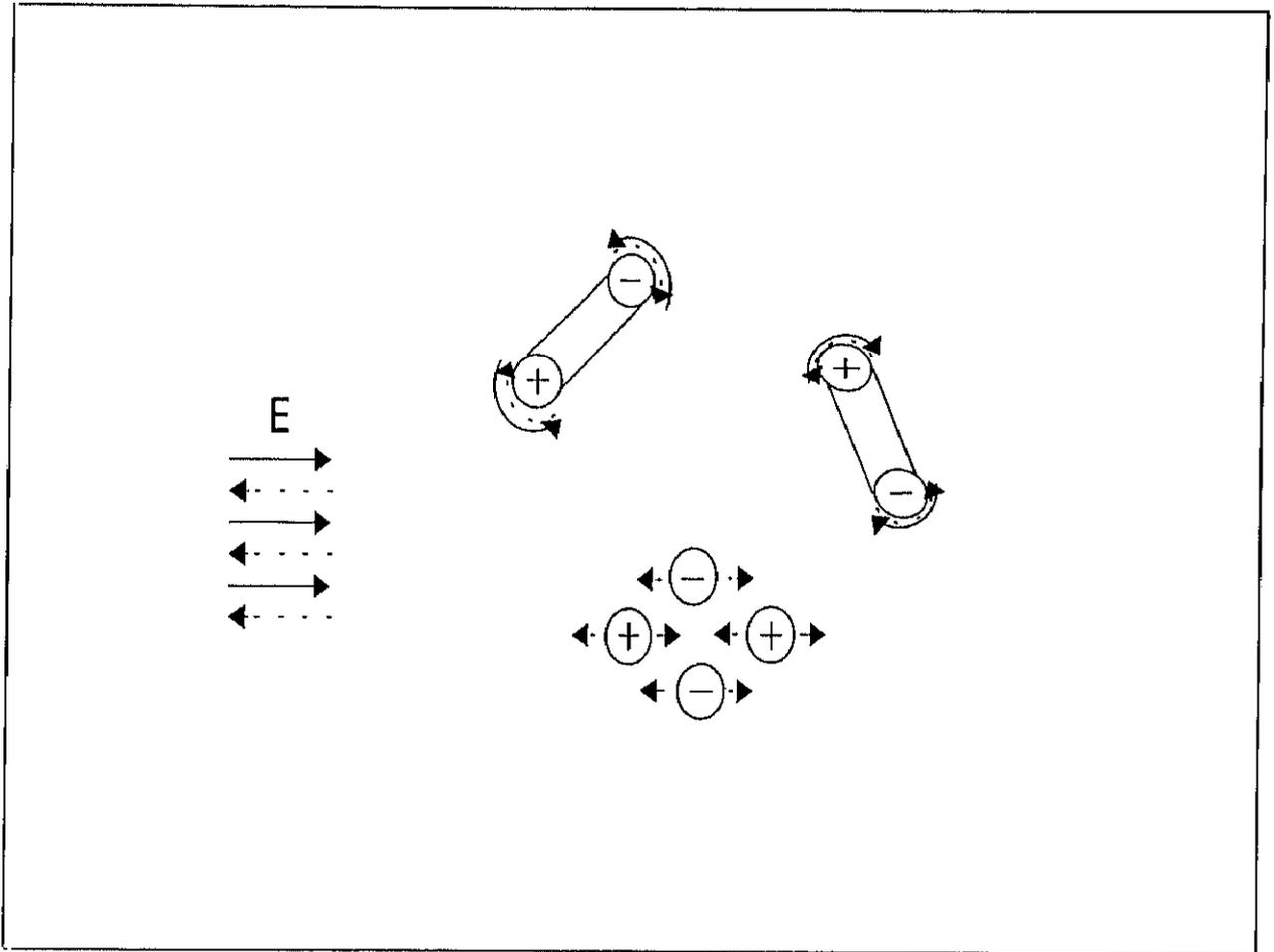


Figura 1. Mecanismos de calentamiento mediante microondas: rotación dipolar y migración iónica (Gallmann y Eberhard, 1992)

En relación a los efectos de las microondas sobre los microorganismos, algunos estudios apuntan la posibilidad de que existan efectos no térmicos causantes de la letalidad (Fleming, 1944; Chipley y col., 1980). Sin embargo, se ha demostrado que la inactivación microbiana se debe exclusivamente al calor originado en el interior del alimento (Lechowich y col., 1969; Vela y Wu, 1979; Baldwin, 1983; Jahngen y col., 1990; Díaz-Cinco y Martinelli, 1991).

Pese al gran número de ventajas que ofrece el tratamiento con microondas, existen una serie de inconvenientes tales como la limitada aplicación en alimentos de gran volumen, el elevado coste de las instalaciones y la falta de uniformidad en la distribución de la temperatura en el interior del alimento. Este último aspecto es bastante importante ya que repercute en la calidad final del producto tratado.

Si no existe un adecuado control de la uniformidad del calentamiento, pueden aparecer los llamados "puntos fríos", con el riesgo de dar lugar a una inactivación microbiana incompleta y los "puntos calientes" donde pueden tener lugar degradaciones térmicas excesivas con el consiguiente detrimento en las propiedades sensoriales y en el valor nutritivo del alimento (Ohlsson, 1990). Por todo esto es preciso conocer los factores que afectan al calentamiento, tanto los relacionados con las propias radiaciones como con las características inherentes al alimento. A continuación se comentan los más relevantes.

1.3.1. Factores más importantes que inciden en el calentamiento

1.3.1.1. Diseño del equipo

Hay que considerar:

a) Tipo de horno.

Debido a los problemas que plantea la falta de uniformidad en el calentamiento con microondas, las empresas encargadas de la fabricación de los equipos han estudiado diferentes posibilidades en cuanto al diseño del horno se refiere, para mejorar la uniformidad en los tratamientos.

Una de las posibilidades existentes es la utilización de hornos en los cuales el alimento reciba la radiación directamente desde el magnetrón. En este caso, los "puntos calientes y fríos" tienen una posición más o menos fija (Ohlsson, 1983).

El otro modelo existente en el mercado posee una cavidad de paredes metálicas en la que se coloca el alimento. Este no se encuentra sometido directamente a la acción de las microondas, sino que, el magnetrón se encarga de originarlas y luego pasan por un conducto de paredes impermeables a las mismas hasta llegar a la cavidad metálica donde se producen una serie de reflexiones creándose un sistema multirresonante. En este caso, la distribución de los "puntos calientes y fríos" es irregular y no previsible (Ohlsson, 1983).

Por otra parte, es importante tener en cuenta la disposición del alimento en el horno. Debido a que el campo electromagnético que se origina en el horno no es uniforme, pueden existir zonas con una mayor o menor concentración de radiaciones dando lugar a distintas velocidades de calentamiento del alimento en función de su emplazamiento en el horno (Hayward y Kropf, 1980; Risman y col., 1987).

Con objeto de minimizar los problemas derivados de la falta de uniformidad dentro de los hornos microondas, se han propuesto algunos sistemas tales como distribuidores de microondas y soportes giratorios dentro de la cavidad (Harrison, 1980; Mudgett, 1986).

b) Frecuencia utilizada.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de los equipos operan a unas frecuencias de 915 y 2450 MHz dependiendo de la legislación existente en cada país.

La diferencia entre una frecuencia y otra se manifiesta en la capacidad de penetración de las microondas. Así, cuando se utiliza la de 915 MHz dicha capacidad aumenta con respecto a la de 2450 MHz, consiguiéndose en el primero de los casos una mayor uniformidad en el tratamiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta diferencia es pequeña a temperaturas elevadas, que son las que se emplean para la destrucción de microorganismos en la mayoría de los alimentos (Ohlsson, 1983; Mudgett, 1986).

c) Potencia.

Se encuentra relacionada con la velocidad de calentamiento, de tal forma que, cuanto mayor es la potencia menos tiempo se tarda en alcanzar la temperatura deseada. La potencia necesaria para producir un calentamiento uniforme depende de las características propias del producto así como de su temperatura inicial (Schiffmann, 1986) y de la frecuencia de radiación (Mudgett, 1989) .

1.3.1.2. Composición y propiedades físicas del alimento

Las propiedades físicas de un alimento están relacionadas con la composición química del mismo. Entre las propiedades físicas caben destacarse las dieléctricas: constante dieléctrica o capacidad de un alimento para almacenar energía eléctrica y factor de pérdida dieléctrica o capacidad de un alimento de disipar la energía eléctrica en forma de calor. Dichas propiedades son especialmente importantes en el caso de los tratamientos térmicos de alimentos con microondas.

La capacidad de penetración de las microondas depende de la composición del alimento y como consecuencia de las propiedades dieléctricas del mismo. Así, valores grandes de profundidad de penetración indican que la energía es absorbida pobremente, mientras que valores pequeños ponen de manifiesto que el calentamiento se produce principalmente en la superficie que es donde se manifiesta una mayor absorción de las radiaciones (George y Burnett, 1991).

Cuando la concentración de agua libre y sales disueltas es muy elevada, las microondas tienen menor capacidad de penetración produciéndose mayor absorción de la energía en la superficie que en el interior y como consecuencia una menor uniformidad de calentamiento en la muestra (Dealler y Lacey, 1990; Giese, 1992; Dealler y col., 1992).

Las propiedades dieléctricas pueden variar con la temperatura. Así, conforme ésta aumenta, disminuye la constante dieléctrica. Sin embargo, el factor de pérdida dieléctrica aumenta o disminuye con la temperatura dependiendo del tipo de alimento (Giese, 1992).

El calor específico de un alimento es otra propiedad física que también influye en el tratamiento térmico con microondas. El calor específico se puede definir como la cantidad de calor ganada o perdida por unidad de peso en un

producto, para alcanzar una variación deseada en la temperatura sin producir alteración en el estado físico del mismo. Un alimento con calor específico bajo y escasa capacidad intrínseca para aumentar su temperatura en un campo electromagnético, puede llegar a calentarse en dicho campo. Tal es el caso del aceite, el cual tiene un bajo valor de factor de pérdida dieléctrica pero se calienta mediante microondas en un tiempo razonable dado su bajo calor específico (Heddleson y Doores, 1994).

1.3.1.3. Tamaño y forma del alimento

- Existe una correlación directa entre el tamaño del alimento y la potencia del microondas que debe ser aplicada para realizar un calentamiento (Schiffmann, 1986), pero, hay que tener en cuenta que existe un límite a partir del cual si se incrementa el nivel de potencia se puede producir un deterioro excesivo del alimento (George y Burnett, 1991). Para evitar sobrecalentamientos del alimento no deben utilizarse volúmenes demasiado grandes, porque cuando un alimento es de gran tamaño puede dificultarse la penetración de las microondas y originarse sobrecalentamientos en la superficie. En estos casos es importante que el alimento posea un elevado valor de conductividad térmica para así mejorar la uniformidad en el calentamiento (Schiffmann, 1986).

Se ha comprobado que cuanto más lisa sea la superficie más uniforme es el calentamiento. Por lo que se refiere a la forma la esférica es la geometría ideal seguida de la cilíndrica (Decareau, 1992). Los alimentos con bordes pronunciados sufren calentamientos localizados en dichos bordes a diferencia de los alimentos con superficies redondeadas en los cuales se eliminan los sobrecalentamientos en las esquinas, sin embargo son más susceptibles a sufrir efectos de focalización de la energía en el interior. Los efectos de focalización se han observado en esferas y en cilindros (Ohlsson y Risman, 1978; Prosetya y Datta, 1991) y dependen del diámetro y de la conductividad térmica del producto, así como de la frecuencia empleada

(Heddleson y Doores, 1994).

1.3.2. Tratamiento térmico de leche mediante microondas

En cuanto a las aplicaciones de las microondas en la industria láctea, en los laboratorios de investigación de Unilever, se estudió un proceso de esterilización de leche mediante microondas para prevenir la formación de depósitos pero resultó demasiado costoso para ser comercializado a escala industrial (Sale, 1976). Posteriormente se han llevado a cabo procesos de esterilización y pasteurización de leche en flujo continuo y en régimen discontinuo, así como secado y evaporación de leche líquida (Decareau, 1985), pasteurización de yogur y queso (Reuter, 1980; Taborsak y Basic, 1984) y descongelación de mantequillas (Meredith, 1986; Svenson, 1987).

1.3.2.1. Pasterización y esterilización

La mayor parte de los trabajos recogidos en la bibliografía acerca de pasteurización y esterilización con microondas en productos lácteos se refieren principalmente a leche, siendo su objetivo principal el estudio del efecto de dichas ondas electromagnéticas sobre los microorganismos. Pero también es de gran interés conocer las modificaciones que pueden producirse en los componentes de la leche cuando se somete a la acción de estas radiaciones, así como la influencia de la composición en el comportamiento térmico durante el tratamiento térmico con microondas.

a) Efecto sobre los microorganismos.

Fueron Hamid y col. (1969) los primeros en pasteurizar leche cruda con microondas en flujo continuo y discontinuo en un intervalo de temperaturas desde 74,4°C hasta 88,9°C durante 14 segundos. La eficacia de la pasteurización en

discontinuo, en cuanto a destrucción de microorganismos se refiere, resultó ser del 99,9% frente a un 92,7% para la pasteurización en continuo. Las diferencias entre los dos procesos podrían ser debidas a un control inadecuado de la temperatura.

Aplicando una pasteurización en flujo continuo con microondas similar a un proceso HTST, Jaynes (1975) obtuvo una leche fosfatasa negativa y con recuento microbiológico, tanto de coliformes como de totales, similar al de la pasteurizada convencionalmente. Al realizar el análisis sensorial de la leche calentada por microondas y convencionalmente, el 37% de los catadores notaron diferencias entre ambos tipos de leche, prefiriendo el 21% la leche tratada por microondas.

Merin y Rosenthal (1984), compararon dos procesos LTLT (63°C durante 30 minutos) realizados con microondas y convencionalmente. El primero provocó una mayor reducción en el número de microorganismos totales siendo el test de la fosfatasa negativo en los dos casos.

Con el fin de examinar la posibilidad de aumentar la vida media de la leche pasteurizada, investigadores de la Universidad de Cornell (E.E.U.U.) (Chiu y col., 1984) realizaron un estudio en el cual lotes de 200 mL de leche pasteurizada se exponían a la acción de las microondas durante tiempos de 85, 97, 100 y 120 segundos, alcanzando las muestras de leche unas temperaturas de 45, 50, 55 y 60°C, respectivamente. Una vez calentada la leche, se procedió a su enfriamiento y almacenamiento a 6,7°C durante 8 y 11 días. En la leche calentada con microondas a 45°C durante 65 y 85 segundos no se redujo el número de bacterias totales y psicrotrofas, respectivamente. El resto de calentamientos produjo una importante reducción en el número de las mismas, de tal forma que, las muestras calentadas en las condiciones más energéticas presentaron una vida útil de ocho días.

Por otra parte, se han llevado a cabo una serie de trabajos en los que se han estudiado el efecto de las microondas sobre microorganismos específicos. Así

Stearns y Vasavada (1986) y Knutson y col. (1988) indicaron que pese a que algunos tratamientos con microondas domésticos pueden implicar una reducción importante en el número de bacterias en la leche, la pasteurización con microondas no siempre resulta completa ya que algunos microorganismos tales como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorencens*, pueden sobrevivir en los llamados "puntos fríos", los cuales se originan debido a la falta de uniformidad en la distribución de la temperatura, tal y como se comentó anteriormente.

Galuska y col. (1989) estudiaron también el efecto de las microondas sobre microorganismos patógenos en la leche, como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphilococcus aureus*. Dichos autores concluyeron que el procesado de la leche con microondas, a temperaturas inferiores a 75°C, no inactiva totalmente dichos microorganismos.

Choi y col. (1993b), en un estudio sobre la influencia del volumen de muestra en el tratamiento con microondas, inocularon con *Listeria monocytogenes* leche entera esterilizada. Muestras de 20 mL leche calentadas en microondas durante 10 minutos a 71,1°C no presentaban células de *Listeria*. Sin embargo, la inactivación fue menos efectiva cuando el volumen de leche fue de 50 ó 100 mL. Estos mismos autores (1993a) inoculando con *Yersinia enterocolitica* y *Campilobacter jejuni* leche esterilizada pudieron comprobar que *Campilobacter* se inactivaba completamente a los tres minutos de tratamiento, sin embargo *Yersinia* resultó ser más resistente al tratamiento, ya que fueron necesarios 8 minutos para inactivarse.

b) Efecto sobre los componentes

En leche y productos lácteos son escasos los trabajos realizados hasta el momento sobre este tema. Así, en 1984, Merin y Rosenthal hicieron un estudio de las transformaciones que sufren las proteínas lácteas durante el calentamiento con microondas y convencional. Comprobaron que el tratamiento con microondas

produce una mayor desnaturalización de las proteínas de suero que el tratamiento convencional.

Kudra y col. (1991), diseñaron un equipo de flujo continuo para calentar agua, leche, nata y soluciones de algunos componentes lácteos por separado tales como grasa, proteínas y lactosa. Realizaron un estudio de la temperatura en los diferentes sistemas calentados para comprobar la influencia de la composición en el calentamiento. Demostraron que la leche se calienta más rápidamente que el agua y que son las proteínas, en las concentraciones normalmente encontradas en la leche, las que contribuyen en mayor medida al calentamiento.

Una de las transformaciones producidas por el tratamiento con microondas que ha levantado más polémica es la de los aminoácidos. Lubec y col. (1989) indicaron que, en fórmulas infantiles calentadas por microondas, los aminoácidos podrían alterarse transformándose las formas trans- en cis- y las formas L- en D-. Esto suponía que pudieran producirse cambios importantes en los péptidos y en las proteínas a nivel estructural, funcional e incluso inmunológico, así como alteraciones neurológicas, ya que la D-prolina, originada por isomerización, puede llegar a ser neurotóxica. Por todo ello, las autoridades sanitarias recomendaron no utilizar las microondas como medio de calentamiento de fórmulas infantiles.

Sin embargo, los resultados obtenidos posteriormente por Segal (1990) y Bögl (1990) diferían de los de Lubec y col. (1989), ya que los primeros consideraban que no existían motivos de alarma con respecto a la isomerización de aminoácidos mediante microondas. Segal (1990), indicó que la D-prolina es neurotóxica inyectándose directamente en el cerebro de animales de experimentación y que los D-aminoácidos entran en el tracto gastrointestinal, expuesto constantemente a los D-aminoácidos procedentes de las paredes celulares bacterianas y son modificados por la acción de la D-aminoácido oxidasa. Por otra parte, la concentración de cis-hidroxiprolina (formada también por isomerización) encontrada en fórmulas

infantiles de leche calentadas con microondas, podría representar un porcentaje muy bajo (0,1%) del total de la concentración de hidroxiprolina.

Fue a partir de 1991, cuando empezaron a esclarecerse las dudas con respecto a este tema. Así, los trabajos de Fay y col. (1991) y Marchelli y col. (1992), pusieron de manifiesto que, condiciones normales de tratamiento de leche o de fórmulas infantiles con microondas, no producen una racemización significativa de las proteínas y los aminoácidos libres.

Jonker y Plenninks (1992) realizaron un estudio comparativo del valor nutritivo de soluciones de caseína calentadas con microondas y convencionalmente, en animales de experimentación. Las condiciones de tratamiento fueron similares en ambos casos, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante dos minutos. Los resultados no mostraron diferencias en el valor nutritivo de dicha proteína entre los dos tipos de tratamiento.

En la determinación de sólidos totales, Fernández-Márquez y col. (1992) calentaron leche mediante microondas y convencionalmente para la eliminación de agua. Pudieron comprobar una mayor formación de HMF, compuesto formado en etapas avanzadas de la reacción de Maillard, en el primero de los casos.

Las vitaminas son otros de los componentes lácteos en los que se ha iniciado el estudio de su modificación por el calentamiento con microondas. Vidal-Valverde y Redondo (1993) comprobaron el efecto de este calentamiento sobre el contenido de tiamina de leches con distinto contenido en grasa. El calentamiento con microondas aplicado destruye parcialmente el contenido en tiamina, siendo este efecto directamente proporcional a la temperatura y al tiempo e inversamente proporcional a los niveles de grasa.

En 1994, Medrano y col. estudiaron el efecto de las microondas en condiciones domésticas sobre el contenido en riboflavina, α -tocoferol y retinol en

leche entera, semidesnatada y desnatada. Los resultados muestran que estas condiciones de calentamiento (2 y 4 minutos al 100% potencia) afectan ligeramente al contenido en los componentes estudiados. La cantidad de riboflavina apenas se modifica después del calentamiento durante 2 minutos en cualquier tipo de leche estudiada. En el caso de leche semidesnatada se observa un descenso de α -tocoferol (15%), siendo el efecto menos pronunciado en el caso del retinol (10%). Para la leche entera no se vieron variaciones apreciables en el contenido de tocoferol y retinol en ninguna de las condiciones estudiadas. Los tratamientos de 4 minutos no modificaron en ningún caso el contenido de las vitaminas estudiadas con respecto a los de 2 minutos.

Sieber y col. (1993) estudiaron la influencia del calentamiento por microondas en distintos componentes lácteos tales como nitrógeno no caseínico, proteínas de suero, lisina disponible y vitaminas B₁ y C, realizando la toma de muestra en diferentes zonas del sustrato calentado. Comprobaron que en la superficie de la muestra disminuía el contenido de nitrógeno no caseínico, sin embargo no ocurría lo mismo con el resto de componentes lácteos estudiados. Estos datos pusieron de manifiesto la existencia de gradientes de temperatura en la leche calentada con microondas, siendo el fondo la zona más fría y la superficie la más caliente. Resultado que está de acuerdo con los obtenidos por Eberhard y col. (1990, 1991).

Si bien la mayor parte de los trabajos existentes sobre pasterización y esterilización de leche con microondas se refieren a leche de vaca, es importante mencionar que también se han estudiado leches de otras especies. El-Shibiny y col. (1982) observaron una gran reducción en el contenido en microorganismos en leche de búfala tratada con microondas respecto a la leche cruda. Trataron 50 mL de muestra tiempos de 120, 130, 140 y 150 segundos, siendo las temperaturas alcanzadas de 86, 94, 96 y 98°C, respectivamente. La desnaturalización de las proteínas de suero producida por efecto del calentamiento con microondas fue menos pronunciada (30%) que en una pasterización convencional en discontinuo (40%),

pero superior a la de tratamientos HTST (5%).

Thompson y Thompson (1990), propusieron un método bastante sencillo para pasteurizar leche de cabra a nivel doméstico. La temperatura elegida fue de 65°C, mantenida durante 30 minutos. En estas condiciones se produjo una reducción de 5 unidades logarítmicas en cuanto al recuento de bacterias totales en las 25 muestras de leche de cabra estudiadas. Los autores concluyeron que un microondas doméstico podría utilizarse para pasteurizar leche de cabra destinada al consumo diario.

1.3.2.2. Deshidratación

Debido a que las microondas penetran en el interior del alimento y permiten un calentamiento directo provocando un gradiente positivo de presión de vapor del agua desde el interior hacia la superficie acelerando la transferencia de agua, este tipo de tratamiento ha sido ampliamente utilizado en la eliminación de agua en leche. Existen algunos trabajos relacionados con este tema que se refieren por una parte, a determinación del extracto seco (Hamada y Thomasow, 1987; Fernández-Márquez y col., 1992; Kent y col., 1993) y por otra, a la obtención de productos en polvo (Ben-Souda y col., 1989; Sochanski y col., 1990). En todos los casos se observó una reducción en el tiempo de tratamiento con respecto a los procesos de deshidratación convencionales.

1.4. EVALUACION DE LA INTENSIDAD DE LOS PROCESOS TERMICOS APLICADOS A LA LECHE

Actualmente es de gran interés tanto para la industria láctea como para la Administración la evaluación de la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la leche. Por ello se recurre a la utilización de una serie de indicadores térmicos que permitan conocer el tratamiento térmico aplicado y diferenciar leches procesadas térmicamente. De esta forma, se puede evitar el sobreprocesado de la leche lo cual supone un incentivo para la industria láctea, ya que mejora la calidad final del producto.

Para la evaluación del deterioro originado en la leche durante el tratamiento térmico de la misma existen una serie de métodos basados, por una parte, en la determinación de compuestos ausentes en la leche cruda y que se originan mediante el calentamiento, y, por otra, en la evaluación de la degradación producida en alguno de los componentes presentes en la leche cruda.

Entre las diferentes transformaciones de los componentes de la leche cruda producidas por el calentamiento que han sido estudiadas, merecen ser destacadas la reacción de Maillard, isomerización de la lactosa y desnaturalización de las proteínas de suero.

Hasta los años 80, la mayor parte de los estudios se centraron en la determinación de compuestos originados durante la reacción de Maillard, fundamentalmente HMF y pérdida de lisina disponible.

El HMF se origina como consecuencia de la degradación de carbohidratos y de los compuestos de Amadori. Keeney y Basette (1959) propusieron un método colorimétrico para determinar el HMF total en leches esterilizadas. Sin embargo este método presenta el inconveniente de que junto con el HMF total pueden

cuantificarse otros compuestos carbonílicos procedentes de la reacción de Maillard. Van Boekel y Rehman (1987) y posteriormente Morales y col. (1992) propusieron un método rápido y específico para la determinación de HMF por HPLC. La utilización de este parámetro como único indicador del tratamiento térmico no es adecuada (Burton, 1984) ya que puede inducir a error debido a que, como se ha demostrado, la leche cruda tiene concentraciones variables de HMF (Klostermeyer y col. 1978; Konietzko, 1981; Dehn-Müller y col. 1991).

La determinación de lisina disponible es otro indicador de la reacción de Maillard que se ha estudiado también en los últimos años. Durante las primeras etapas de la reacción de Maillard, la lisina transformada en lactulosil-lisina no es asimilable durante el proceso digestivo, denominándose lisina disponible a aquella que no se encuentra ligada al carbohidrato. Los métodos que se utilizan para la determinación de este aminoácido se basan en la reacción específica de determinados compuestos con el grupo ϵ -amino libre: fluorodinitrobenceno (Carpenter, 1960), guanidación (Mauron y Bujard, 1963), ácido trinitrobencenosulfónico (Kakade y Liener, 1969) y fijación de colorantes (Hurrell y Carpenter, 1976). Estos métodos son poco específicos por lo que la medida de lisina puede ser errónea. En estudios posteriores, Tomarelli y col. (1985) realizaron modificaciones en el método basado en la reacción con ácido trinitrobenceno sulfónico, encaminadas a disminuir los tiempos de análisis y obtener una mayor precisión en la medida de los derivados.

Otra forma de evaluar la lisina disponible es mediante la determinación del compuesto de Amadori, lactulosil-lisina, originado en las primeras etapas de la reacción de Maillard. Así, Henle y col. (1991) determinaron el porcentaje de lisina ligada a carbohidratos en muestras de leche por la medida de la lactulosil-lisina liberada mediante una hidrólisis enzimática previa.

Hoy en día existe la tendencia a utilizar conjuntamente varios indicadores del deterioro originado en la leche durante el tratamiento térmico, ya que al utilizarlos de forma individual existe el riesgo de que no se haga una evaluación correcta. Actualmente, tanto en la FIL como en la UE, tienen como objetivo definir y establecer los parámetros analíticos que permitan diferenciar leches calentadas. Para ello, proponen una serie de índices de calentamiento, algunos de los cuales han sido objeto de estudio a lo largo de los últimos años: lactulosa, furosina, relación lactulosa/furosina, β -lactoglobulina sin desnaturalizar, fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa.

1.4.1. Lactulosa

La determinación de lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) es el método más ampliamente utilizado en la evaluación de la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la leche. Adachi (1958) detectó la existencia de lactulosa en leche estéril sobrecalentada y pudo comprobar que su formación depende de la intensidad del tratamiento térmico aplicado. Fueron Martínez-Castro y Olano en 1978, los primeros en manifestar que las leches esterilizadas tienen un contenido superior en lactulosa que las leches UHT y éstas a su vez superior que las pasterizadas. Por ello, estos autores propusieron la determinación de lactulosa en leche como posible índice del tratamiento térmico.

Durante el tratamiento térmico de la leche, la lactosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosil) se convierte en lactulosa y a continuación se produce la degradación de la lactulosa a ácidos α - y β - isosacarínicos y galactosa. La formación de lactulosa se produce mediante el reordenamiento de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (Richards y Chandrasekhara, 1960). Esta reacción está catalizada por la presencia de citratos y fosfatos, responsables en gran medida del pH de la leche (Martínez-Castro y Olano, 1980; Geier y Klostermeyer, 1983; Martínez-Castro y col., 1986; Olano y col., 1987).

Con respecto a la influencia de la grasa en la formación de lactulosa, los trabajos realizados hasta el momento ponen de manifiesto resultados contradictorios. Así, Geier y Klostermeyer (1983) y Andrews (1984) indicaron que no existe relación entre el contenido en grasa de la leche y la isomerización de lactosa a lactulosa. Sin embargo, De-Koning y col. (1990) encontraron, en tratamientos UHT, una mayor formación de lactulosa en leches con un 3% de grasa, frente a otras con 1.5%. Un estudio realizado por Pellegrino (1994) sobre la influencia de la grasa en leche y nata calentadas en condiciones de tiempo y temperatura controladas, puso de manifiesto que, conforme aumenta el contenido en grasa se produce una menor formación de lactulosa. Esto puede atribuirse a que la presencia de grasa provoca una menor transferencia de calor al incrementar la viscosidad de la leche, alcanzando por tanto, menor temperatura las leches enteras.

Uno de los mayores problemas que se plantean a la hora de cuantificar la lactulosa, es la baja concentración que presenta con respecto a la lactosa, por ello, se han propuesto una serie de métodos para eliminar esta última, realizándose posteriormente la cuantificación de lactulosa mediante métodos específicos de cetosas (Andrews, 1986).

El resto de los métodos incluyen técnicas espectrofotométricas, enzimáticas y cromatográficas, siendo estas últimas las que presentan mayor sensibilidad y precisión, por lo que nos referiremos a ellas más extensamente.

Las técnicas cromatográficas que más se emplean hoy en día para el análisis cuantitativo de lactulosa son la cromatografía de gases (CG) y de líquidos (HPLC). La principal ventaja de la primera frente a la segunda es la mayor sensibilidad que presenta para una reproducibilidad semejante, además de lograrse una adecuada separación entre lactulosa y el resto de carbohidratos. El análisis de lactulosa por cromatografía de gases precisa de una derivatización previa con objeto de obtener un compuesto fácilmente volátil, siendo los TMS derivados los empleados en la

mayor parte de los casos.

Los TMS derivados de la lactulosa se separan de los de lactosa en un rango de temperaturas comprendido entre 200 y 260°C, dependiendo del tipo de fase, soporte y gas portador. Los tipos de columnas utilizadas son: clásicas de acero inoxidable, microrrellenas y capilares de vidrio y sílice fundida. La separación óptima entre lactosa y lactulosa se puede conseguir mediante el uso de fases como OV-17, OV-25 y SE-54 (Martínez-Castro y Olano, 1980; Nikolov y Reilly, 1983). La resolución que se obtiene con columnas capilares es superior a la obtenida mediante columnas rellenas, sin embargo, Olano y col. (1986) propusieron un método utilizando columnas microrrellenas con el cual se obtiene una resolución satisfactoria y permite el análisis cuantitativo de lactulosa en tiempos inferiores a 20 minutos.

Con respecto a la HPLC, se comenzó utilizando la cromatografía de intercambio iónico en condiciones isocráticas (Verhaar y col., 1979) o en gradiente (Ersser y Mitchel, 1984), con el empleo de diferentes columnas tales como Dowex (Carubelli, 1966), Aminex (Verhaar y col., 1979) y polietilenaminas, preparadas, estas últimas, en el laboratorio (Bilik y col., 1979).

La cromatografía líquida en fase inversa ha sido ampliamente utilizada (Nikolov y col., 1985), empleándose columnas de C₁₈ y como eluyente acetonitrilo/agua (Greig y Payne, 1985). Para la detección de lactulosa en el ultravioleta es necesaria una derivatización previa debido a que los carbohidratos no absorben a 200 nm. Los detectores más empleados son los de índice de refracción, sin embargo son menos sensibles que los de ultravioleta y, además, su utilización implica que la elución deba realizarse de forma isocrática (Brons y Olieman, 1983). Posteriormente, Ersser y Mitchell (1984), utilizaron detectores amperométricos para el análisis de carbohidratos. El acoplamiento del HPLC y la detección amperométrica puede resolver muchos de los problemas encontrados en los análisis

de lactulosa a bajas concentraciones (Fleming y col., 1990).

La electroforesis capilar también se ha utilizado para la separación de lactulosa en mezclas complejas de carbohidratos (Oefner y col., 1992). La utilización de detectores amperométricos permite la detección incluso en el rango de femtomoles (Colon y col., 1993).

Mediante la reacción de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein, además de originarse lactulosa puede también formarse epilactosa (4-O- β -galactopiranosil-D-manopiranososa). Este carbohidrato fue aislado de la leche por primera vez por Martínez-Castro y Olano (1980) y aparece cuando el tratamiento térmico es muy severo. Olano y Martínez-Castro (1981) detectaron epilactosa en leche esterilizada y comprobaron que existe un período de latencia que retrasa su aparición con respecto a la de lactulosa. Olano y Calvo (1989) propusieron que el contenido en epilactosa podría utilizarse también como indicador del tratamiento térmico.

1.4.2. Furosina

La furosina se origina mediante hidrólisis ácida a partir de los compuestos de Amadori formados en las primeras etapas de la reacción de Maillard. Este compuesto fue detectado por primera vez (Erbersdobler y Zucker, 1966) como un pico desconocido en cromatogramas de hidrolizados de leches en polvo desnatada sobrecalentada, comprobándose que su formación aumentaba con la intensidad del tratamiento térmico de las muestras. Posteriormente fue identificado como ϵ -N-(2-furoilmetil)-L-lisina por UV, IR, RMN y espectrometría de masas, confirmándose su estructura mediante síntesis (Finot y col., 1968; Heyns y col., 1968).

El aumento de la furosina es lineal durante la fase inicial del calentamiento pero en estados avanzados de la reacción de Maillard el contenido en furosina decrece (Hurrell y col., 1983). Esto hace que sea un buen indicador del grado en el

que se produce el deterioro durante los primeros estadios de la reacción de Maillard, sin embargo no es un índice adecuado cuando la leche ha sido sometida a condiciones severas de calentamiento (Burton, 1984).

Existen estudios acerca del contenido en furosina de leches pasterizadas y UHT (Erbersdobler y col., 1984; Erbersdobler y col., 1987; Nangpal y col., 1990; Resmini y col., 1990; Corzo y col., 1994) y de la formación de furosina durante el almacenamiento de leche UHT (Corzo y col., 1994).

La técnica más utilizada para el análisis de furosina desde su identificación en hidrolizados ácidos de leche, fue la cromatografía de intercambio iónico empleando autoanalizadores de aminoácidos. La furosina eluye en la región de los aminoácidos básicos (Erbersdobler y Zucker, 1966; Finot y col., 1968; Finot y col., 1969; Finot y Mauron, 1969). Posteriormente, se consiguió mayor sensibilidad utilizando la fluorimetría como sistema de detección (Erbersdobler y col., 1984; Erbersdobler, 1986).

En 1981, Schleicher y Wieland desarrollaron un método de HPLC para la determinación de furosina en muestras biológicas de pacientes diabéticos, colocando dos columnas en serie. Posteriormente, Drexel y col. (1987) modificaron el método anterior y lograron reducir los tiempos de análisis aumentando la resolución de los distintos componentes. Chiang (1983) utilizó una sola columna para el análisis de furosina por HPLC en alimentos desecados, y Cefalu y col. (1991) detectaron este aminoácido en muestras biológicas mediante cromatografía de intercambio iónico y con un sistema de detección amperométrico. Resmini y col. (1990) determinaron mediante HPLC el contenido en furosina incluso en leches pasterizadas. Delgado y col. (1992) propusieron un método nuevo por HPLC en fase inversa para la determinación de furosina en leche. Las ventajas que presenta este método frente al anterior son: elución isocrática, reducción del tiempo de análisis y ausencia de disolventes halogenados en la fase móvil que pueden dañar las conexiones metálicas

del equipo.

Otra técnica cromatográfica empleada para el análisis de furosina es la cromatografía de gases. Para la detección se utiliza un detector específico de fósforo-nitrógeno, realizando una derivatización previa formando los heptafluorobutiril-isobutil ésteres (Büser y Erbersdobler, 1985), aunque existe el riesgo de degradación durante la derivatización (Ruttkat y Erbersdobler, 1994).

1.4.3. Relación lactulosa/furosina

Este índice de calentamiento se ha propuesto recientemente como indicador de calidad de leches comerciales por Corzo y col. (1994). Su determinación permite conocer la calidad y las condiciones de almacenamiento de una leche UHT. Dependiendo del tipo de leche de que se trate esta relación varía; así, una leche UHT presenta un valor comprendido en el rango 6,38-13,78, mientras que en una leche en polvo este rango es de 0,23-1,1. Esto indicaría que la reacción de isomerización de la lactosa se da en mayor grado en la leche UHT, mientras que en una leche en polvo predomina la reacción de Maillard. La diferente relación lactulosa/furosina en estos dos tipos de leche permitiría determinar la adición de leche en polvo reconstituída en leche UHT.

Estos autores también estudiaron la variación de la relación lactulosa/furosina durante el almacenamiento de leche UHT a distintas temperaturas. Conforme aumenta la temperatura de almacenamiento, la relación lactulosa/furosina disminuye debido a que la reacción de Maillard predomina sobre la isomerización de la lactosa durante el almacenamiento. Por tanto, este indicador pone de manifiesto las condiciones en las que ha sido almacenada la leche UHT.

En función de las relaciones lactulosa/furosina encontrados en leche UHT se considera que valores por debajo de 6 podrían indicar un almacenamiento

inadecuado o adición de leche en polvo reconstituída.

Posteriormente, Pellegrino y col. (1994) obtuvieron resultados similares cuando utilizaron dicha relación como índice de calidad en leches esterilizadas.

1.4.4. β -lactoglobulina sin desnaturalizar

La β -lactoglobulina es una de las proteínas del suero lácteo. Se conoce como proteínas de suero a la fracción proteica de la leche que permanece en disolución después de la precipitación de las caseínas a pH 4,6. Las proteínas de suero mayoritarias son la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina. En la fase sérica de la leche existen otras seroproteínas, como son la BSA, las inmunoglobulinas, y la lactoferrina, así como una serie de enzimas tales como lactoperoxidasa, catalasa y fosfatasa alcalina.

El tratamiento térmico provoca desnaturalización de las proteínas de suero, produciéndose cambios en la estructura secundaria y terciaria, pero manteniéndose los enlaces peptídicos. Como consecuencia de esta reacción, los grupos activos de las proteínas son más susceptibles a interactuar entre sí, además de hacerlo con los grupos activos de otras proteínas o bien de otros compuestos tales como azúcares reductores (lactosa).

El comportamiento de las tres proteínas de suero mayoritarias (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina y BSA) frente al calor es distinto. Así, la α -lactoalbúmina es más resistente al tratamiento térmico que la β -lactoglobulina y ésta a su vez más que la BSA. Dicho comportamiento depende de la especie animal de que se trate. Así, Calvo y col. (1989) realizaron tratamientos térmicos desde 74 hasta 90°C durante 15 y 30 segundos en leche de vaca, cabra y oveja y comprobaron que la desnaturalización para la β -lactoalbúmina se incrementaba en el siguiente orden: vaca<cabra<oveja, sin embargo en el caso de la BSA la desnaturalización resultó ser

cabra< vaca<oveja.

El grado de desnaturalización de las seroproteínas depende de la intensidad del tratamiento térmico aplicado. Uno de los criterios que se utiliza para la diferenciación de leches sometidas a distintos tratamientos térmicos es la evaluación de la desnaturalización de la β -lactoglobulina por ser una proteína de termosensibilidad intermedia. La BSA al ser la más termosensible se desnaturaliza casi totalmente en procesos UHT, y su desnaturalización no es un buen índice de calentamiento. Por ello la desnaturalización de la β -lactoglobulina se ha propuesto como índice térmico para diferenciar leches UHT de leches esterilizadas en botella, y leches sometidas a alta pasteurización de leches pasteurizadas por el proceso HTST (Andreini y col., 1990).

Existe la posibilidad de medir las seroproteínas desnaturalizadas mediante la evaluación del contenido en cisteína y cistina (aminoácidos presentes de forma mayoritaria en las proteínas de suero) del complejo aislado de caseínas y seroproteínas desnaturalizadas (De-Koning y col., 1976; Mrowetz y Klostermeyer, 1977). Sin embargo, actualmente, se utiliza más la determinación de las proteínas de suero no desnaturalizadas mediante Kjeldahl de la fracción sérica (Aschaffenburg y Drewry, 1959), métodos inmunológicos (Lyster, 1970), electroforéticos (Dannenberg y Kessler, 1988) y cromatográficos, principalmente HPLC (González de Llano y col., 1990).

En un principio se utilizaron métodos por HPLC basados en mecanismos de exclusión molecular (Andrews y col., 1985; Hill y col., 1987). También se utilizó la cromatografía de intercambio iónico (Hill y col., 1987) y la cromatografía en fase inversa (Kim y col., 1987; Resmini y col., 1989; Parris y Baginski, 1991). Actualmente el método de Resmini y col. (1989) es el que está propuesto como oficial en la FIL para la determinación de proteínas de suero sin desnaturalizar.

1.4.5. Fosfatasa alcalina

Es una fosfomonoesterasa y contiene ácido siálico, zinc y magnesio (Lefranc y Han, 1969), siendo su pH óptimo de 9,6. Kitchen y col. (1970), encontraron esta enzima asociada a un complejo lipoproteico presente en la membrana del glóbulo graso. Forma parte del complejo fosfatásico de la leche que agrupa enzimas (nativas y microbianas) capaces de hidrolizar el enlace éster entre el ácido fosfórico y el radical hidroxilo de numerosos compuestos tales como glicerofosfatos, fenil fosfatos, etc. (Veisseyre, 1980).

Es una enzima termosensible, y se inactiva en condiciones de tiempo y temperatura a las cuales se destruye el *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo patógeno cuya destrucción sirve de referencia para asegurar una pasteurización eficaz. Por ello es el indicador de elección para comprobar que este tratamiento en la leche ha sido el adecuado (Griffiths, 1986). En la figura 2 se pueden apreciar los intervalos de tiempo y temperatura de calentamiento en los que se inactiva la fosfatasa alcalina. Hay que tener en cuenta que a veces se producen fenómenos de reactivación de dicha enzima durante la conservación de la leche calentada (Veisseyre, 1980); por ello, Mckellar y col. (1994) postularon que la fosfatasa alcalina no es el indicador más adecuado para el control de leches pasteurizadas. Sin embargo, el test de la fosfatasa alcalina se sigue considerando como el parámetro enzimático de elección para leches pasteurizadas recién procesadas.

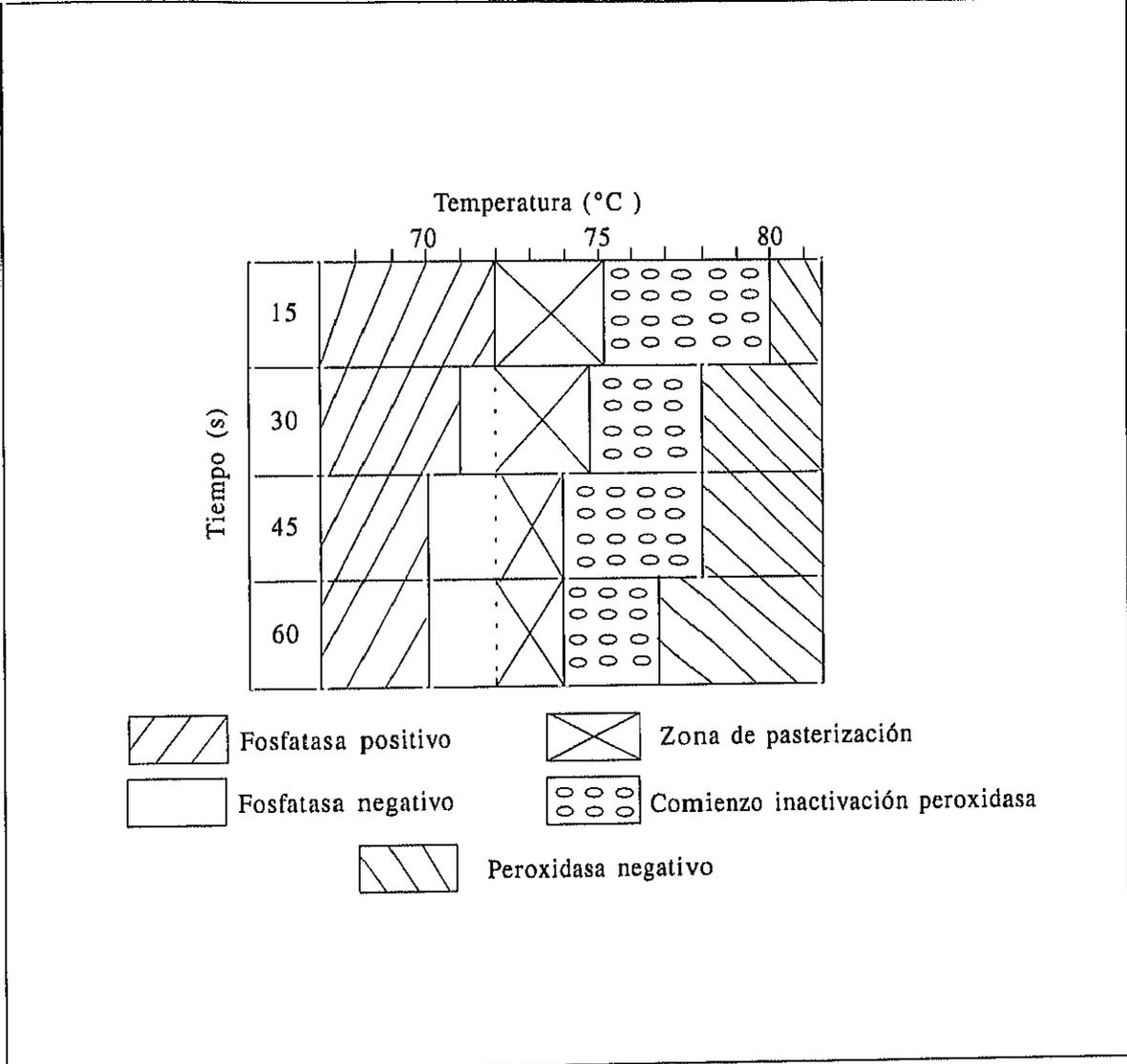


Figura 2. Zonas de calentamiento para la inactivación de la fosfatasa y la peroxidasa (Veisseyre, 1980)

Para la prueba de la fosfatasa el método más ampliamente utilizado es el de Aschaffenburg y Mullen (1949), en el que se emplea como reactivo el paranitrofenilfosfato disódico. En este método hay que tener en cuenta la posible producción de fosfatasa de origen bacteriano, el fenómeno de reactivación y la fosfatasa residual.

En leche de cabra este test no es fiable, ya que dicha enzima se encuentra en menor proporción que en la leche de vaca, además de presentar menor termoestabilidad (Williams, 1986; Kosikowski, 1988). Por todo esto, Williams (1986) propuso una variación al test anterior para la leche de cabra aumentando tanto la cantidad de muestra como el tiempo de incubación de la misma.

1.4.6. Lactoperoxidasa

Es una ferro-enzima que cataliza la acción oxidante del agua oxigenada liberando oxígeno activo que puede combinarse con numerosas sustancias: guayacol, parafenilendiaminas, hidroquinonas, etc. Se encuentra en la leche en cantidad apreciable y su pH óptimo es de 6,8 (Amiot, 1991).

La inactivación de la lactoperoxidasa ocurre a temperaturas próximas a 80°C, afectando en menor medida el tiempo de calentamiento (Kiermeier y Kayser, 1960; Woerner, 1961). Su detección es la base para identificar las leches que han sido sometidas a calentamientos de 80°C durante 5-25 segundos (alta pasteurización) y así diferenciarlas de las pasteurizadas (72°C durante 15 segundos o equivalente) (Amiot, 1991). En la figura 2, se muestra un gráfico en el que se pueden observar los intervalos de tiempo y temperatura en los que se inactiva la peroxidasa.

Durante el almacenamiento, puede desarrollarse actividad lactoperoxidásica. A medida que el tratamiento es más severo existe menor posibilidad de posterior reactivación (Woerner, 1961).

1.4.7. Límites propuestos por la FIL y por la UE para los principales indicadores térmicos

Uno de los principales objetivos de la FIL y de la UE es el de establecer los límites permitidos en cuanto al contenido de algunos indicadores térmicos, o presencia o ausencia de otros indicadores. Esto queda reflejado en la tabla 2. De esta forma se podrán diferenciar leches pasterizadas de altamente pasterizadas y leches UHT de leches esterilizadas en botella.

Tabla 2. Índices de calentamiento de leche propuestos por la UE (*) y por la FIL. (Buchheim y col., 1994).

<i>Tipo de tratamiento</i>	<i>Lactulosa (mg/L)</i>	<i>β-Lactoglobulina (mg/L)</i>	<i>Fosfatasa alcalina</i>	<i>Lacto-peroxidasas</i>
<i>Pasterización</i>	ND*	>3000 >2600*	-	+
<i>Alta Pasterización</i>	<50*	>2000 >2000*	-	-
<i>UHT</i>	<400 >100*	>50*	-	-
<i>Esterilización</i>	<1200 >600*	<50*	-	-

ND: no detectable.

1.5. EVALUACION DEL PERIODO DE VIDA UTIL DE LA LECHE PROCESADA

Los tratamientos térmicos que se aplican a la leche no impiden el desarrollo de reacciones de origen tanto enzimático como físico-químico, que pueden dar lugar a alteraciones durante el almacenamiento. Las condiciones aconsejables de tiempo y temperatura para el almacenamiento dependen del tipo de tratamiento al cual se ha sometido la leche.

En términos generales, el período de vida útil de la leche es el tiempo que transcurre desde el procesado/envasado hasta la aparición de características organolépticas desagradables en la leche, las cuales provocan el rechazo de este alimento por parte del consumidor. La legislación exige que cualquier leche comercial refleje en el envase una fecha indicativa de la vida útil de la misma. Sin embargo, a veces puede ocurrir que el producto permanezca higiénicamente apto para su consumo después de la fecha indicada en el envase (Hankin y col., 1977).

Los indicadores más importantes para evaluar la vida útil de la leche procesada son: análisis sensorial, control microbiológico y estudio del estado de proteólisis de las caseínas durante el período del almacenamiento.

1.5.1. Análisis sensorial

El análisis sensorial nos permite determinar alteraciones organolépticas importantes tales como transparencia, gelificación, presencia de sabores desagradables (rancio, amargo, afrutado, a podrido, etc.), consecuencia de alteraciones físico-químicas y de la formación de compuestos, principalmente péptidos y ácidos grasos de cadena corta, por parte de enzimas proteolíticas y lipolíticas tanto de origen microbiano como nativo (Bucky y col., 1988). Dichas enzimas pueden no ser destruidas totalmente durante el tratamiento térmico o bien proceder de microorganismos contaminantes de la leche después del procesado.

1.5.2. Control microbiológico

En leches pasteurizadas el control microbiológico es muy importante para evaluar el deterioro durante el período de vida útil. La conservación de este tipo de leche se lleva a cabo a temperaturas de refrigeración (4-8°C) a las cuales se produce el crecimiento de bacterias psicotrofas (capaces de desarrollarse a temperaturas iguales o inferiores a 7°C, independientemente de su temperatura óptima de crecimiento) que generalmente proceden de una contaminación posterior al tratamiento térmico.

Por lo general, el período de vida útil de una leche pasteurizada se define como el tiempo necesario para alcanzar un recuento de microorganismos totales de 7,5 log ufc/mL (Chandler y McMeekin, 1985), ó 7 log ufc/mL (Kahn y Firstenberg-Eden, 1987) ó 6,3 log ufc/mL (Kroll y Rodrigues, 1986).

El método de recuento de microorganismos totales (Marshall, 1993), a pesar de ser el oficial para evaluar poblaciones bacterianas de productos lácteos, no diferencia las bacterias que han sobrevivido al tratamiento térmico de las que proceden de una contaminación posterior. Mediante el test de Moseley (Jonhs, 1969), consistente en realizar un segundo recuento de bacterias totales en muestras almacenadas a 7,2°C durante 5 días, se puede averiguar la procedencia de dichas bacterias.

Paralelamente a la determinación de microorganismos totales suelen realizarse otras pruebas, tales como el recuento de coliformes (Marth, 1978) y de psicotrofos (Zall y col., 1982). Aunque todos los contaminantes son importantes, las alteraciones organolépticas más frecuentes en leche pasteurizada durante el almacenamiento se deben a microorganismos psicotrofos post-pasteurización. Además, Zall y col. (1982) encontraron una correlación significativa ($r=0,878$) entre los recuentos de microorganismos totales y de psicotrofos. Las alteraciones organolépticas pueden

empezar a aparecer cuando el número de bacterias psicrotrofas alcanza valores comprendidos entre 6 y 7 log ufc/mL (Ledford y col., 1983).

Un inconveniente de los métodos de control microbiológico citados anteriormente es el tiempo que transcurre hasta obtener resultados, ya que es preciso incubar los microorganismos durante tiempos largos. Sin embargo, las técnicas ideales para predecir la vida útil deben proporcionar resultados en períodos lo más cortos posible (Easter y Prentice, 1989). Por ello, existen métodos más rápidos alternativos basados en la determinación de metabolitos celulares tales como ATP (Phillips y Griffiths, 1985) y piruvato (Suhren, 1990). La medida de piruvato en leche para evaluar la vida útil es, además, un método recomendado por el grupo de expertos de la UE (Stepaniak, 1991). Pueden utilizarse también biosensores para evaluar las actividades metabólicas de los microorganismos y así predecir la vida útil de la leche (Kroll y col., 1989).

1.5.3. Actividad proteolítica y proteolisis de las caseínas

Las caseínas representan el 80% del nitrógeno total de la leche de vaca y constituyen la fracción proteica de la leche que precipita a pH 4,6 y 20°C. Son proteínas muy termorresistentes pero susceptibles a la acción enzimática de proteinasas y exopeptidasas durante el almacenamiento de la leche.

Las enzimas proteolíticas presentes en la leche pueden tener dos orígenes: por una parte puede tratarse de enzimas de origen microbiano (fundamentalmente de bacterias psicrotrofas) o bien ser nativas (plasmina, principalmente).

A pesar de que durante los tratamientos de pasterización las bacterias psicrotrofas son destruidas, pueden permanecer inalteradas enzimas exocelulares, producidos por ellas, que presentan una gran termorresistencia. La mayoría de las proteasas de bacterias psicrotrofas resisten temperaturas muy elevadas y sólo son

parcialmente destruídas por los tratamientos térmicos HTST (72°C durante 15 s) y UHT (138-145°C durante 2s) (Fairbain y Law, 1986). La termorresistencia de estas enzimas es menor a temperaturas más bajas; así West y col. (1978), encontraron que tratamientos a 55°C, por sí solos o seguidos de tratamientos UHT, conducen a una inactivación mayor que el tratamiento UHT aislado. Sin embargo, la aplicación de dichos tratamientos a temperaturas más bajas no siempre resulta efectiva para inactivar el amplio rango de enzimas bacterianas que pueden encontrarse en la leche, por lo que su utilidad comercial es limitada (Griffiths y col., 1981; Christen y Marshall, 1985).

La proteasa nativa de la leche, la plasmina, es muy termoestable. La pasteurización de la leche a 75°C durante 15 segundos disminuye débilmente su actividad, apreciándose un aumento de la misma al ser almacenada dicha leche a 37°C (Noomen, 1975; Richardson; 1983). Este enzima puede resistir algunos tratamientos de esterilización UHT (142°C durante 3 s) (Driessen y Van der Waals, 1978).

Las proteasas bacterianas y nativa actúan de forma diferente sobre las caseínas por lo que influyen de distinto modo en la estabilidad de la leche durante la conservación. La proteólisis acompañada de un incremento en el nitrógeno no proteico y de la formación de para- κ -caseína, es debida a enzimas de origen bacteriano, mientras que la proteólisis debida a la plasmina produce un aumento del nitrógeno no caseínico y la formación de γ -caseína (Renner, 1988).

Los métodos más importantes para evaluar la actividad proteolítica y el estado de la proteólisis de una leche son los siguientes: espectrofotometría (McKellar, 1981), estudio de la fracción nitrogenada soluble a pH 4,6 mediante Kjeldahl, estudio de las diferentes fracciones nitrogenadas solubles en ácido tricloroacético mediante HPLC (López-Fandiño y col., 1993a) y análisis de la fracción caseínica de la leche mediante electroforesis nativa o en presencia de agentes desnaturizantes (López-Fandiño y col., 1993b).

OBJETIVOS

Los factores que intervienen en la distribución del calor durante el tratamiento con microondas son de muy diversa naturaleza: características físico-químicas del alimento, tamaño y forma del mismo, diseño del horno, frecuencia utilizada, etc.

La leche es uno de los alimentos líquidos de los que existe mayor información sobre parámetros indicadores de la intensidad de procesos térmicos, así como del deterioro durante la conservación. Por ello es un alimento muy adecuado para el estudio del efecto del tratamiento con microondas.

En el presente trabajo se ha examinado el comportamiento de la leche durante el calentamiento mediante microondas en sistema continuo y discontinuo y se ha comparado con tratamientos térmicos convencionales, con el objeto de establecer condiciones de proceso que aseguren un calentamiento uniforme del producto con el mínimo deterioro de los constituyentes y un período adecuado de vida útil.

Para el estudio del comportamiento térmico de la leche se han utilizado como indicadores: la formación de lactulosa y furosina, así como la desnaturalización de la β -lactoglobulina, por ser los parámetros que proporcionan mayor información sobre la intensidad del proceso. La fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa, la actividad proteolítica y el recuento de bacterias totales se han utilizado en el control de la pasterización de la leche y en la determinación del período de vida útil.

PLAN DE TRABAJO

El trabajo se ha desarrollado de acuerdo con las siguientes etapas:

a) Tratamientos con microondas en discontinuo:

- Estudio de los factores que afectan al tratamiento térmico de leche.
- Determinación del grado de uniformidad del calentamiento.

b) Tratamientos con microondas en continuo:

- Desarrollo de un sistema que permita el tratamiento térmico de la leche en condiciones reproducibles.
- Establecimiento de las condiciones de proceso que aseguren la pasteurización de la leche con el mínimo deterioro de los constituyentes, así como un período de vida útil adecuado.
- Comparación del proceso desarrollado con un tratamiento convencional en condiciones similares.

II. MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MUESTRAS

Tratamientos en discontinuo:

Para la puesta a punto del equipo microondas se utilizó leche comercial desnatada en polvo reconstituída al 10% con agua destilada.

En el caso del estudio del gradiente de temperatura en el interior de la muestra durante el tratamiento térmico con microondas se empleó leche comercial entera UHT.

Se utilizó leche entera, desnatada, concentrado de proteínas, permeado y tampón fosfato 0,1 M con lactosa (5%) pH 6,8, en el estudio de la influencia de la composición láctea en la precisión de los calentamientos mediante microondas. Los diferentes tipos de muestras de leche se obtuvieron a partir de leche cruda procedente de la granja diplomada "La Chirigota", situada en la Comunidad de Madrid.

El estudio comparativo realizado entre los calentamientos de leche con microondas y convencionales se llevó a cabo con leche entera cruda procedente de la granja diplomada comentada anteriormente.

Tratamientos en continuo:

En el caso de la puesta a punto del equipo microondas se utilizó leche UHT comercial entera y desnatada.

El resto de tratamientos se realizó con leche entera cruda de vaca y cabra, procedentes de las granjas "La Chirigota " y "Queserías Ibéricas", respectivamente; ambas situadas en la Comunidad de Madrid.

2.1.1. Preparación de muestras

2.1.1.1. Disolución de lactosa en tampón fosfato

El tampón fosfato 0,1 M con lactosa al 5% y pH 6,8, se preparó mezclando 24,5 mL de Na_2HPO_4 0,2 M y 25,5 mL de NaH_2PO_4 0,2 M, disolviendo en dicha mezcla 5 g de lactosa monohidrato y llevando posteriormente la disolución hasta 100 mL con agua destilada.

2.1.1.2. Desnatado de la leche

La leche entera, mantenida previamente en un baño a 30°C durante 20 minutos, se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 15 minutos y a 5°C. Posteriormente se llevó a un baño de hielo, permaneciendo en el mismo 30 minutos. Por último se retiró la grasa separada mediante una espátula y se filtró a través de lana de vidrio.

2.1.1.3. Ultrafiltración

Mediante ultrafiltración se obtuvo el concentrado de proteínas y el permeado haciendo pasar leche desnatada a temperatura ambiente por un equipo de ultrafiltración (Minitan System, Millipore) provisto de una membrana de 10 KD. La leche recirculó hasta que se alcanzó un factor de concentración de 2,75.

2.1.1.4. Homogeneización

La leche se homogeneizó a 40°C en un equipo homogeneizador (TR 50, Janke and Kunkel, IKA-Werk) durante 5 minutos a 50 Hz. Una vez preparadas las muestras se atemperaron en un baño de agua a 25°C para posteriormente realizar los tratamientos térmicos.

2.1.1.5. Envasado aséptico

El envasado de la leche procesada en continuo y destinada al estudio del período de vida útil se llevó a cabo en recipientes estériles de 500 mL utilizando una campana de flujo laminar (GELAIRE, Mod. TC120, nivel de seguridad 2).

2.2. TRATAMIENTOS TERMICOS

Se realizaron diferentes tratamientos térmicos, similares a los más frecuentemente utilizados en la industria: esterilización y pasteurización. Estos calentamientos se llevaron a cabo en discontinuo y también en flujo continuo.

2.2.1. Tratamientos en discontinuo

2.2.1.1. Horno microondas

Los tratamientos térmicos mediante microondas se realizaron en un equipo MDS-2000 (CEM Corporation) (figura 3) operando al 100% de potencia (532 W) y con una frecuencia de 2450 MHz en el magnetrón. El horno del microondas posee unas dimensiones de 48,9 x 45,7 x 60,9 cm (anchura x altura x profundidad) y está recubierto de un material especial que absorbe el exceso de energía para proteger al magnetrón y favorecer la uniformidad en la distribución de las microondas. También con el objeto de mejorar dicha uniformidad, contiene un distribuidor de las mismas y un soporte giratorio de teflón que gira a 6 r.p.m. y que tiene doce posiciones para la colocación de los recipientes (figura 4).

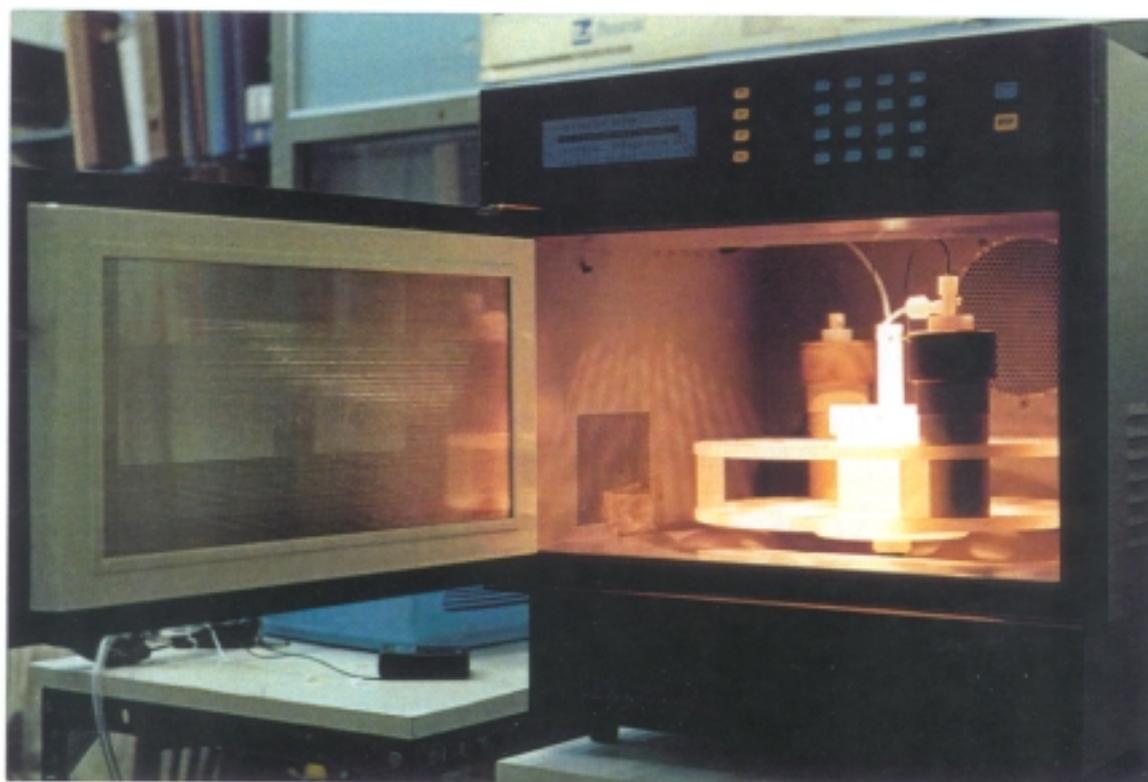


Figura 3. Equipo microondas MDS-2000 (CEM Corporation)

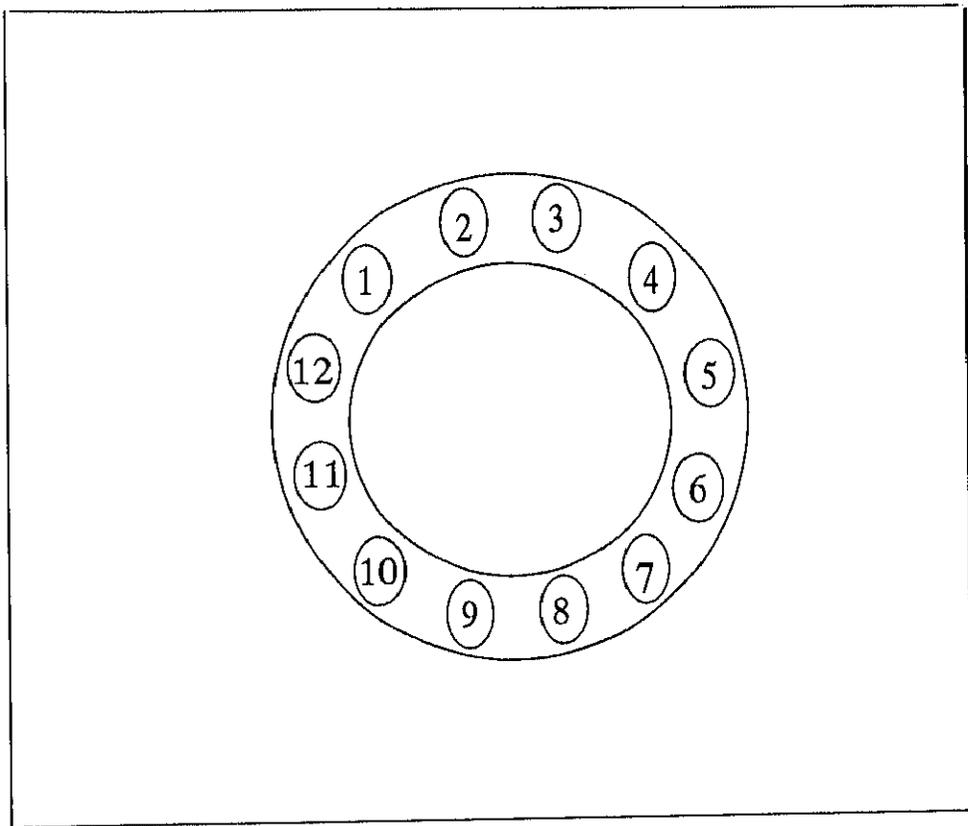


Figura 4. Distribución de los recipientes en el soporte giratorio del horno microondas MDS-2000 (CEM Corporation)

Los recipientes utilizados son de teflón y constan de un vaso cilíndrico (3,6 x 10,5 cm) alojado en otro, denominado cuerpo del vaso, provisto de un tapón de rosca. Uno de los recipientes lleva incorporado un medidor de la presión interna y una sonda de temperatura de fibra óptica, que se introduce en el recipiente protegida con un capilar de vidrio pyrex. En el tapón del recipiente control existen dos orificios en la parte superior para su conexión con los controles de presión y temperatura y sistema de descompresión. En la figura 5 se muestra un esquema del recipiente control. El resto de recipientes sólo están provistos del sistema de descompresión.

La presión y/o la temperatura se miden de forma continua durante el proceso y se registran posteriormente (figura 6) en una impresora Citizen Swift 9 .

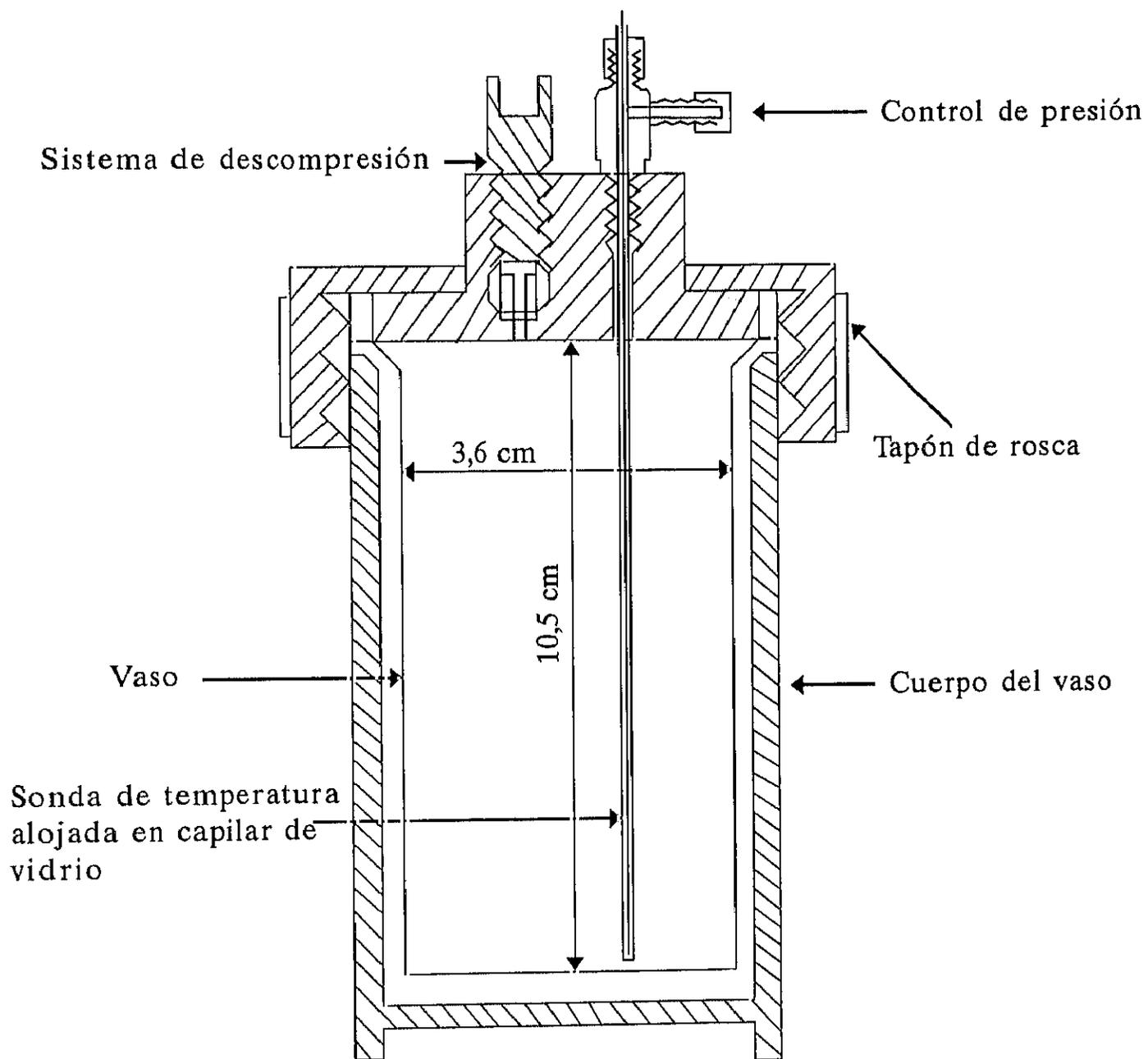


Figura 5. Esquema del recipiente control del equipo microondas MDS-2000.

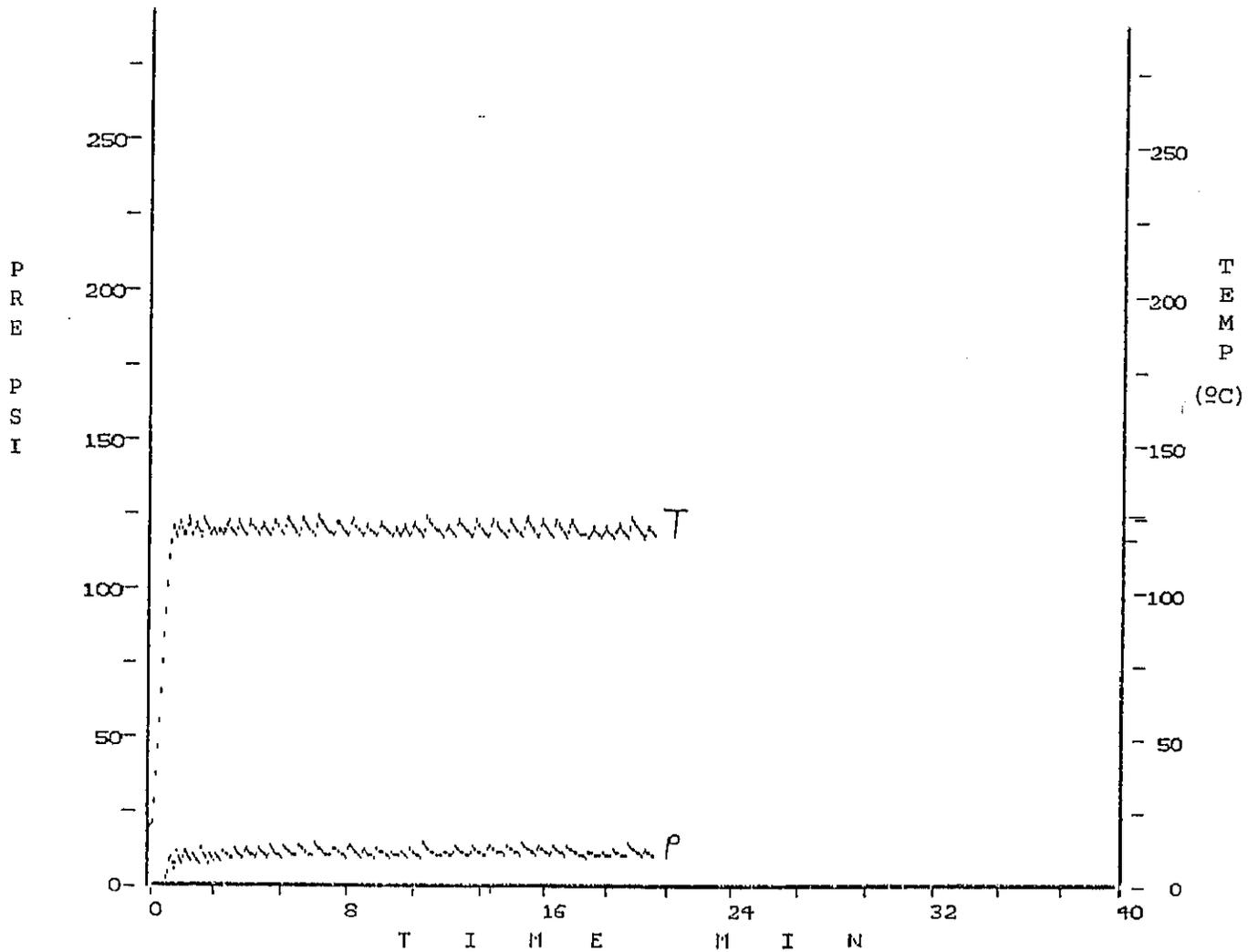


Figura 6. Registros de temperatura (T) y presión (P) correspondientes a los calentamientos con microondas en el horno MDS-2000 (CEM Corporation).

2.2.1.1.1. Comprobación de la potencia del magnetrón

Para llevar a cabo la comprobación de la potencia del magnetrón se siguió el método de Copson (1975). Según este método 1000 mL de agua a 20°C se calientan durante 2 minutos al 100% de potencia, midiéndose posteriormente la temperatura. La potencia se calcula mediante la fórmula $P = 35(W/^{\circ}C)\Delta T$.

2.2.1.1.2. Calibración de la sonda de temperatura

La calibración de la sonda de temperatura se realizó entre 60 y 120°C en un baño de silicona Digiterm 3000613 (Selecta) con sistema de agitación y control de la temperatura ($\pm 1^{\circ}C$). También se utilizó un termómetro de resistencia de platino (Crison, Thermometer 62013).

2.2.1.1.3. Condiciones de calentamiento

Se aplicaron diferentes tratamientos térmicos (al 100% de potencia en el magnetrón) dependiendo del tipo de estudio a desarrollar:

a) Puesta a punto del equipo microondas: Se realizaron calentamientos a 120°C durante 20 minutos, utilizando volúmenes de 5 a 25 mL de muestra y variando tanto el número de recipientes como su posición en el plato giratorio. Los ensayos se repitieron 2, 3 y 7 veces.

b) Estudio del gradiente de temperatura en el interior de la muestra: La medida de temperatura se efectuó después de 10, 14, 20, 25 y 30 segundos de calentamiento, alcanzándose temperaturas entre 37,5 y 85,5°C. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

c) Influencia de los componentes lácteos mayoritarios en el calentamiento por microondas: Se realizaron calentamientos a 100°C durante 10, 20 y 30 minutos. El número de ensayos fue 8.

d) Comparación de calentamientos de leche con microondas y convencionales: Se llevaron a cabo tratamientos térmicos a 70, 100, 110 y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos. Los ensayos se hicieron por duplicado.

Una vez concluidos los tratamientos las muestras se introdujeron en un baño de agua-hielo para enfriar rápidamente la leche calentada y así, evitar transformaciones de los componentes lácteos, posteriores al período de calentamiento.

2.2.1.2. Baño termostatzado

Los calentamientos convencionales se realizaron en tubos cerrados de acero inoxidable (2,16 mm x 3 m), que permiten una rápida transferencia de calor (Pagliarini y col., 1990), sumergidos en el baño de silicona descrito en el apartado 2.2.1.1.2..

Las condiciones de calentamiento fueron 70, 100, 110 y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos. Los ensayos se hicieron por duplicado utilizando un tubo de acero en cada uno de ellos. Después de cada tratamiento, las muestras se enfriaron rápidamente en un baño de agua-hielo, con el objeto de evitar transformaciones de los componentes lácteos posteriores al periodo de calentamiento.

2.2.2. Tratamientos en flujo continuo

2.2.2.1. Horno microondas

El calentamiento por microondas en flujo continuo se llevó a cabo haciendo circular la leche a través de un tubo de teflón (0,5 x 125 ó 200 cm) situado en el interior del horno, bien en la parte superior izquierda de la pared, bien en un soporte

de PVC colocado en la base del horno, tal y como se muestra en la figura 7. Para posibilitar la entrada y la salida del tubo, cuando éste se encontraba situado en la base del horno, se practicaron dos orificios de 0,7 cm en la parte inferior izquierda de la pared del horno y se colocaron en dichos orificios dos tubos de acero inoxidable en ángulo de 90°, rodeados de tela metálica con el objeto de evitar la fuga de microondas por los orificios practicados.

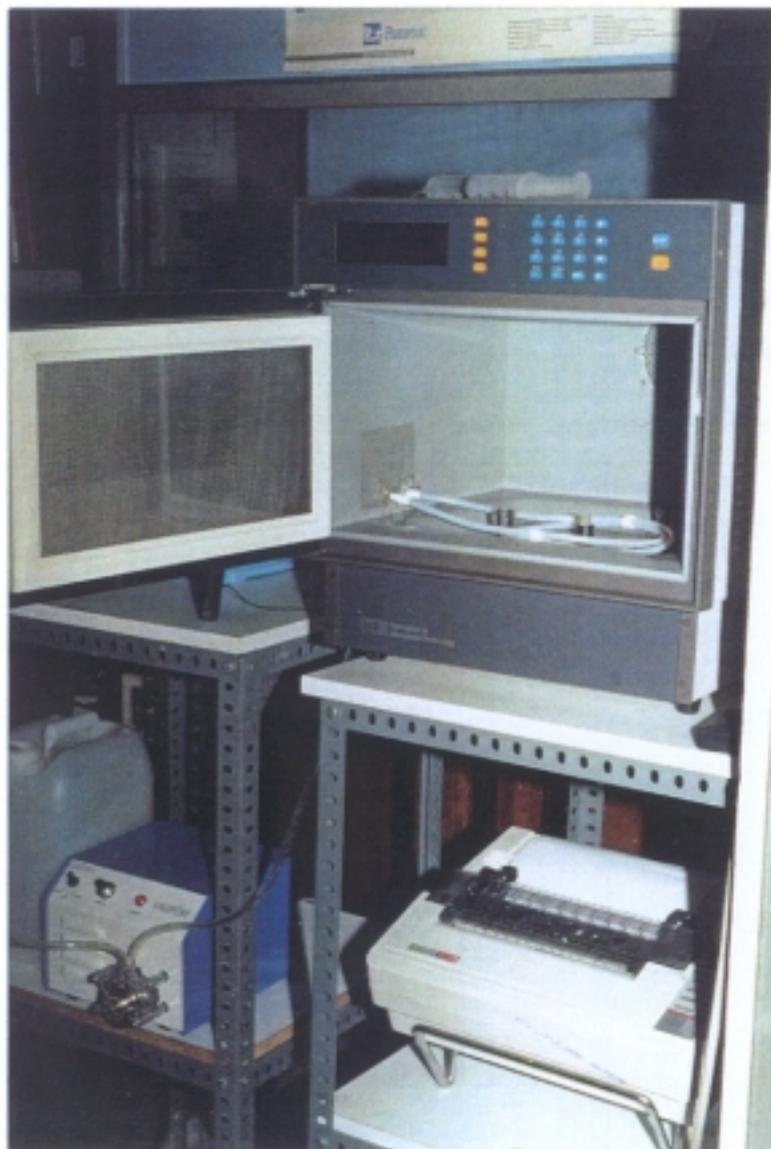


Figura 7. Modificación del equipo microondas MDS-2000 para el tratamiento de leche en flujo continuo.

En el caso de los tratamientos térmicos de pasterización, se conectó, a la salida del horno, el tubo del interior de la cavidad con otro tubo de teflón (0,8 x 45-98 cm) llamado "tubo de mantenimiento", rodeado de material aislante con el objeto de mantener la leche a la temperatura de salida del horno durante un determinado período de tiempo (figuras 8 y 9).

Para impulsar la leche hacia el interior del horno microondas, se acopló al sistema una bomba peristáltica (Variable Speed Tubing Pump, Millipore). Con el fin de alcanzar distintas temperaturas de calentamiento se fueron variando los flujos proporcionados por la bomba, teniendo en cuenta las dimensiones del tubo colocado en la cavidad del horno.

La medida de la temperatura se efectuó a la entrada y a la salida del horno mediante dos termómetros digitales (Digitem 2000) introducidos en piezas de vidrio con forma de T, intercaladas en los tubos de teflón. En el caso de los tratamientos de pasterización se realizó un tercer control de la temperatura mediante otro termómetro digital (Digitem 2000) situado a la salida del tubo de mantenimiento.

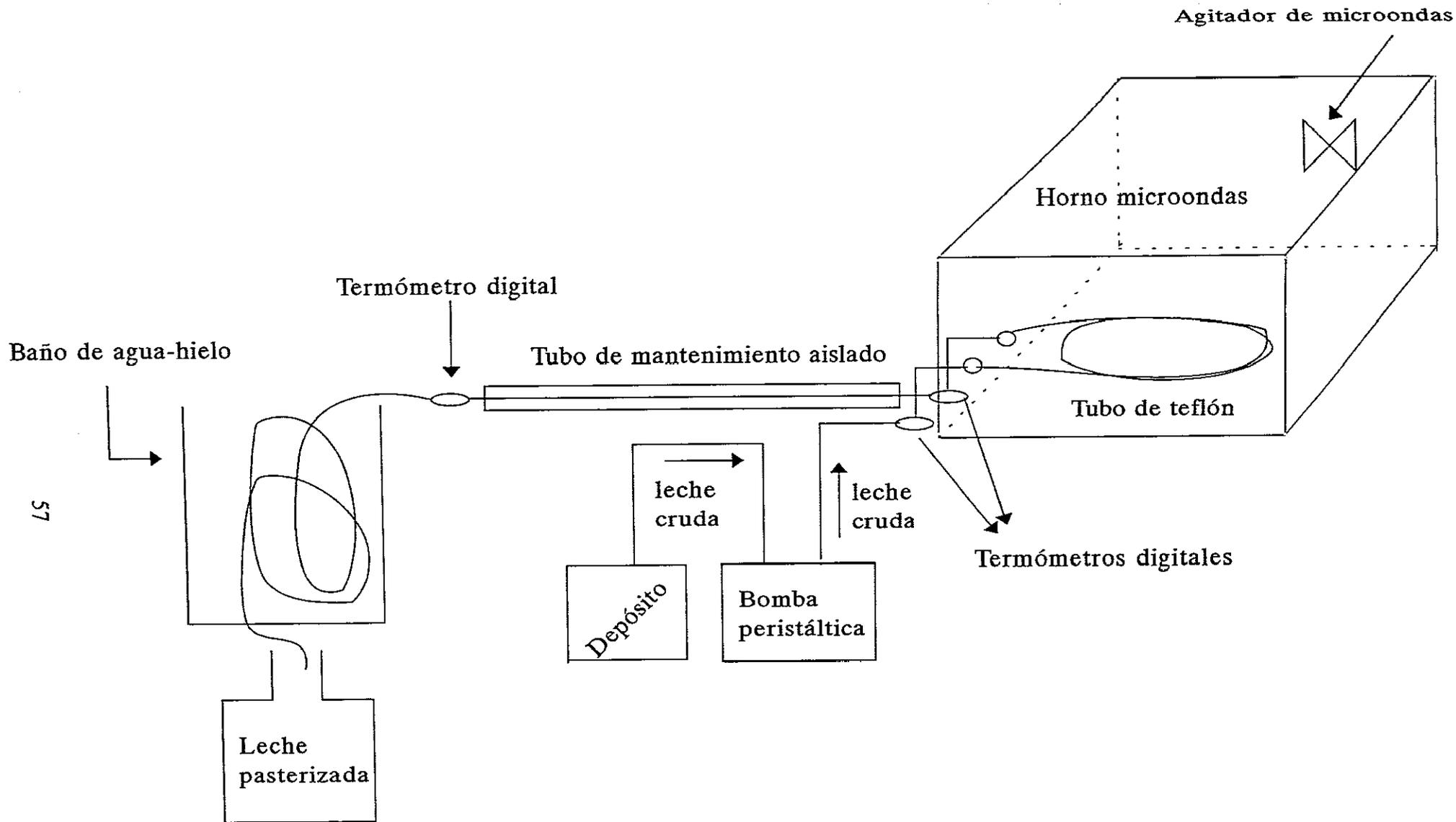


Figura 8. Esquema del sistema de pasterización con microondas.



Figura 9. Vista lateral de la sección de mantenimiento a la salida del horno y acoplamiento de la bomba peristáltica con el horno microondas en el tratamiento en flujo continuo.

2.2.2.1.1. Condiciones de calentamiento

Se aplicaron diferentes tratamientos térmicos (al 100% de potencia en el magnetrón) dependiendo del tipo de estudio a desarrollar:

a) Puesta a punto del equipo microondas: Tratamientos térmicos por duplicado variando el flujo proporcionado por la bomba entre 80 y 160 mL/min. Las temperaturas que se alcanzaron a la salida del horno microondas estuvieron comprendidas entre 96,7 y 61,3°C.

b) Calentamientos de leche de vaca y cabra: Tratamientos térmicos por triplicado variando el flujo proporcionado por la bomba entre 80 y 135 mL/min. Las temperaturas de salida estuvieron comprendidas entre 96,2 y 73,1°C.

d) Pasterización de leche de vaca y cabra: Tratamientos térmicos por triplicado alcanzándose temperaturas de salida próximas a 72, 80 y 85°C que se mantuvieron en el tubo de mantenimiento 0, 15 y 25 segundos.

Una vez finalizados los tratamientos térmicos se hizo pasar la leche a través de un tubo de teflón (0,4 x 200 cm), inmerso en un baño de agua-hielo para proporcionar un rápido enfriamiento.

2.2.2.2. Pasterizador de placas intercambiadoras de calor

Se llevaron a cabo tratamientos de pasterización convencional en un pasterizador de placas intercambiadoras de calor a escala de laboratorio (Armfield, Hampshire, BH24, 1DY) (figura 10). Dicho equipo está diseñado para ser capaz de reproducir las condiciones industriales del proceso HTST.

El sistema está provisto de una bomba peristáltica (Cole Palmer, Kl. 3023290), una zona de placas, un tubo de mantenimiento y una caldera calefactora con agua caliente. La temperatura y el flujo de trabajo se seleccionan a través de una consola control. La zona de las placas consta de tres secciones (figura 11): precalentamiento,

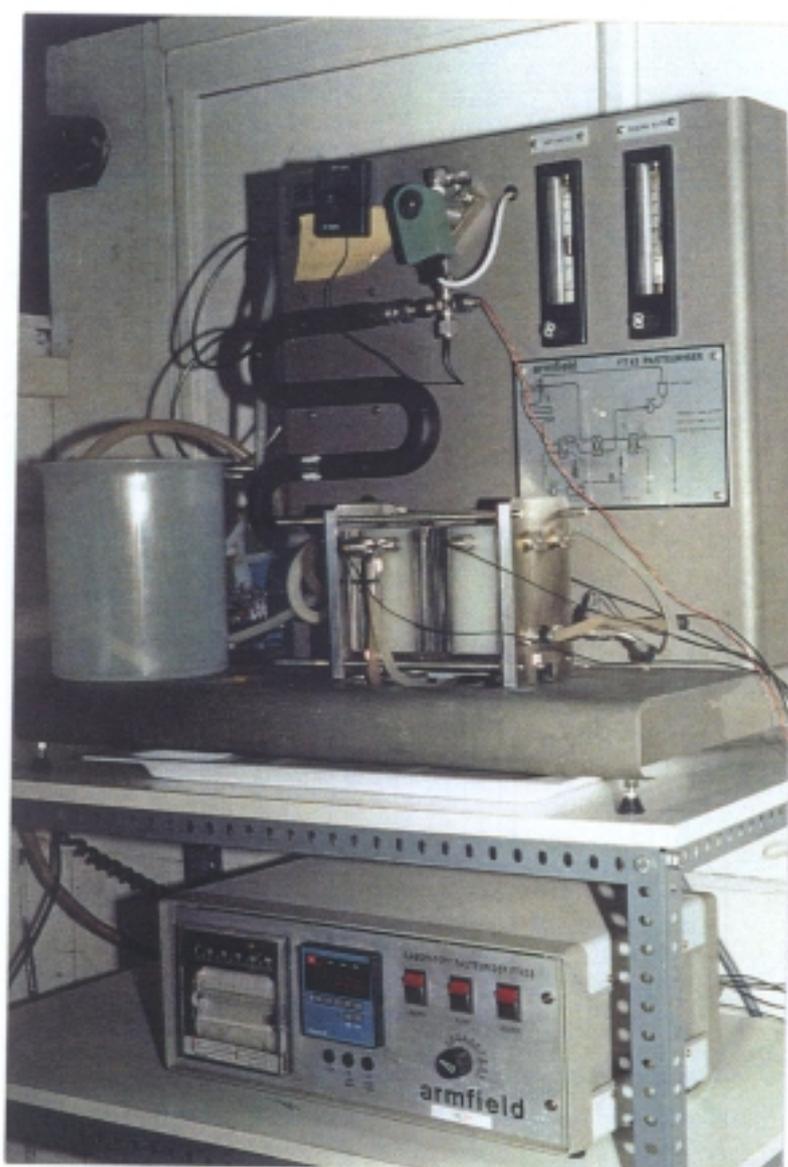


Figura 10. Pasterizador de placas intercambiadoras de calor (Armfield, Hampshire BH24, 1DY).

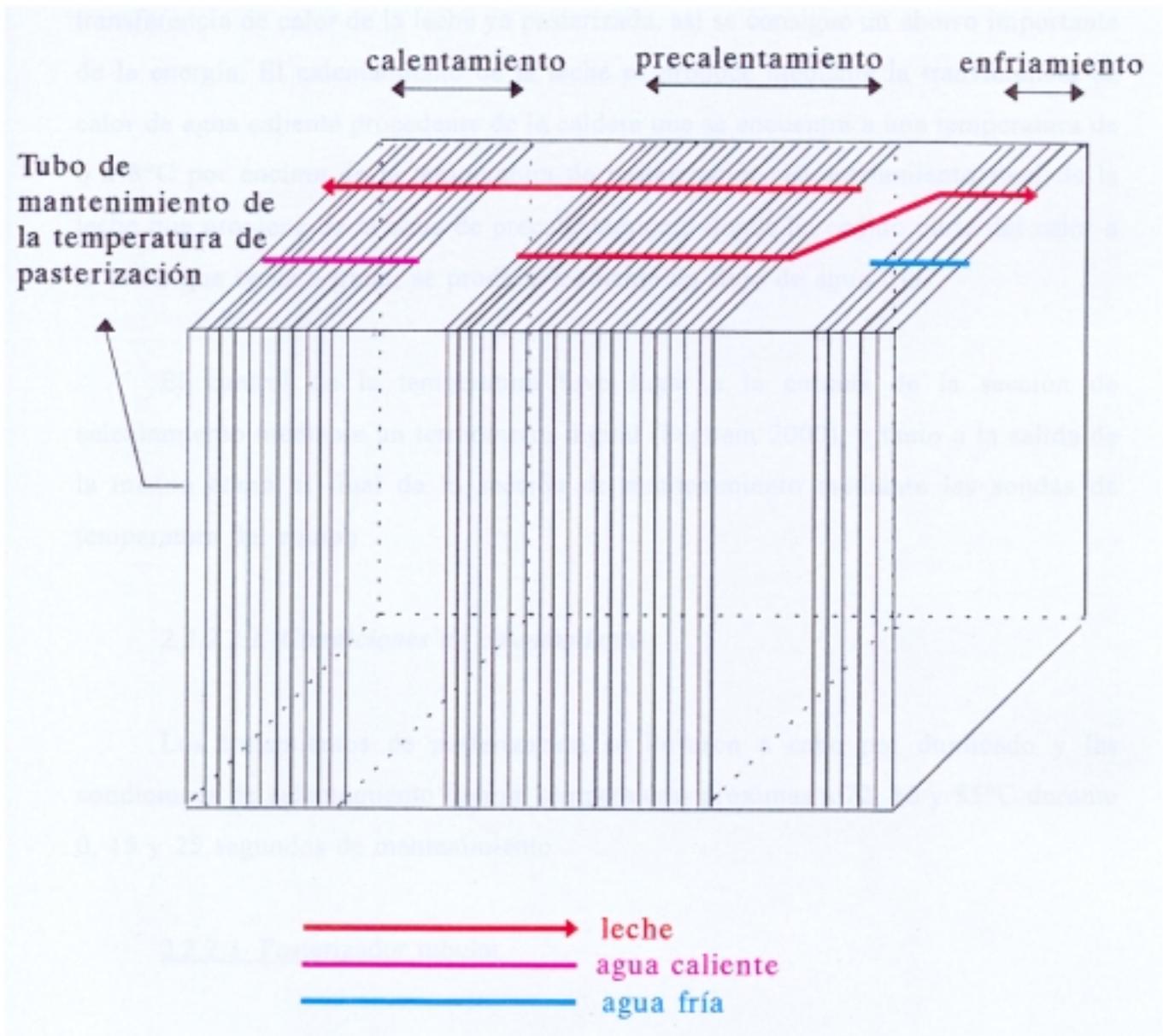


Figura 11. Esquema de la zona de placas del pasteurizador con las tres secciones correspondientes: precalentamiento, calentamiento y enfriamiento.

formada por 19 placas; calentamiento, formada por 11 placas; y, por último, la sección de enfriamiento que consta de 5 placas. El tubo de mantenimiento (1,07 x 83 cm) es de acero inoxidable y se encuentra protegido por un material aislante con objeto de evitar pérdidas de calor. El precalentamiento de la leche a tratar tiene lugar por la transferencia de calor de la leche ya pasteurizada, así se consigue un ahorro importante de la energía. El calentamiento de la leche se produce mediante la transferencia de calor de agua caliente procedente de la caldera que se encuentra a una temperatura de 6 a 8°C por encima de la temperatura de pasteurización. El enfriamiento final de la leche que proviene de la zona de precalentamiento donde ha cedido parte del calor a la leche que se va a tratar, se produce mediante un flujo de agua fría.

El control de la temperatura tuvo lugar a la entrada de la sección de calentamiento mediante un termómetro digital (Digitem 2000), y tanto a la salida de la misma como al final de la sección de mantenimiento mediante las sondas de temperatura del equipo.

2.2.2.2.1. Condiciones de calentamiento

Los tratamientos de pasteurización se llevaron a cabo por duplicado y las condiciones de calentamiento fueron: temperaturas próximas a 72, 80 y 85°C durante 0, 15 y 25 segundos de mantenimiento.

2.2.2.3. Pasterizador tubular

Los tratamientos de pasteurización convencional también se realizaron en un pasterizador diseñado en el laboratorio (figura 12) en el cual el calentamiento se produjo en un tubo de acero inoxidable (0,45 x 157 cm) enrollado en espiral e inmerso en un baño de agua Tectron 3473200 (Selecta), con sistema de agitación y control de la temperatura ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). La temperatura a la salida del tubo de acero se consiguió mediante la regulación de la temperatura del baño de agua, siendo ésta entre 4-7°C

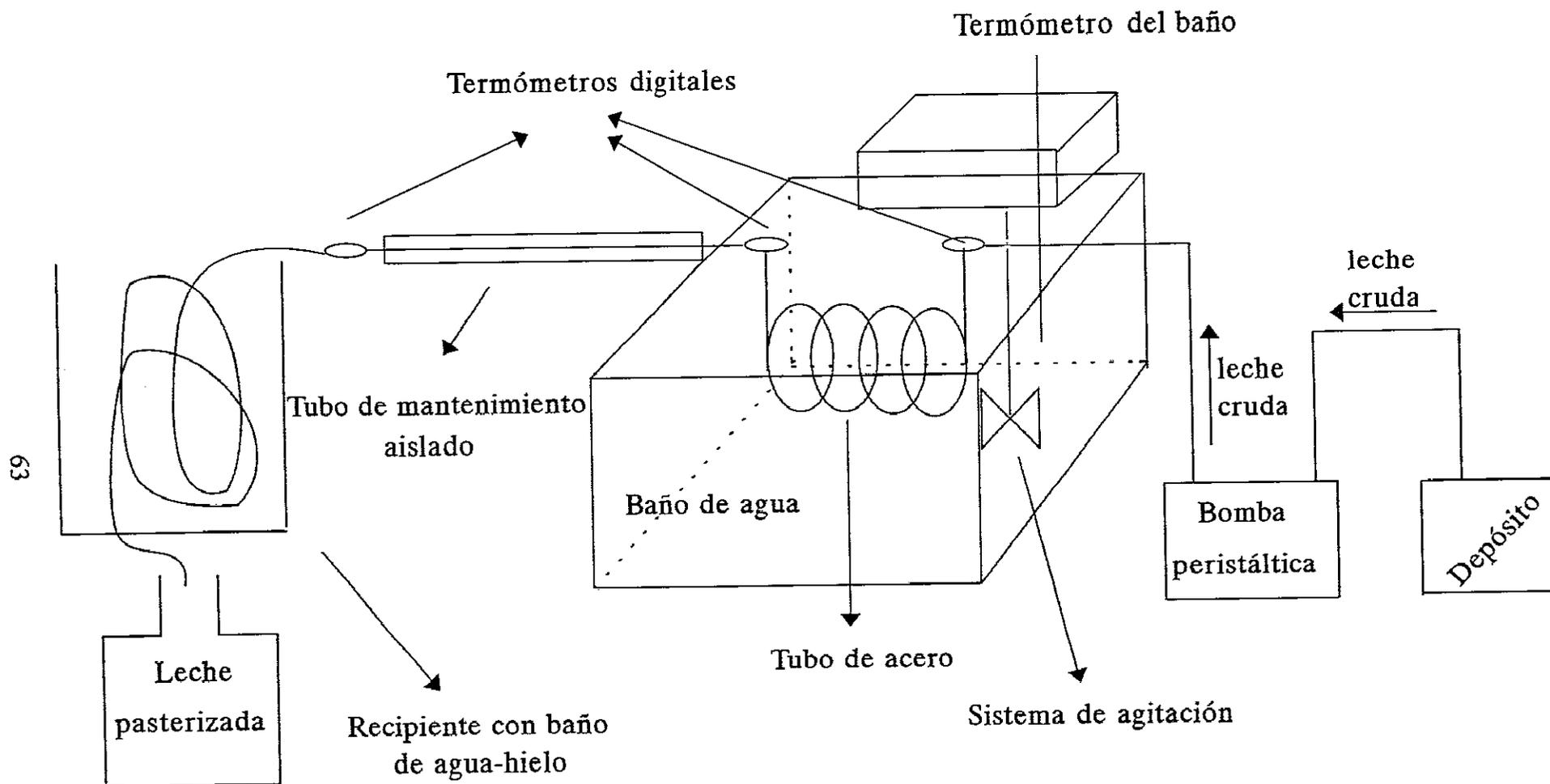


Figura 12. Esquema del pasterizador de tubo de acero.

superior a la temperatura de salida de la leche. Para llevar a cabo las fases de mantenimiento de la temperatura de pasterización y de enfriamiento se utilizaron los mismos tubos descritos para el microondas en el apartado 2.2.2.1.. El control de la temperatura y la propulsión de la leche hacia el sistema se realizó también de la forma descrita en dicho apartado.

2.2.2.3.1. Condiciones de calentamiento

Los tratamientos de pasterización se llevaron a cabo por triplicado a temperaturas próximas a 72, 80 y 85°C durante 0, 15 y 25 segundos de mantenimiento.

2.3. CONSERVACIÓN

Tres lotes de leche de vaca y otros tres de cabra procesados térmicamente en flujo continuo mediante microondas se conservaron a 4-5°C durante 10 días.

Dos lotes de leche pasterizada en flujo continuo mediante microondas y pasterizador de placas se conservaron a 4-5°C durante 15 días.

A lo largo de la conservación se tomó muestra para llevar a cabo la evaluación del período de vida útil de las leches procesadas.

2.4. METODOS ANALITICOS

Con objeto de estudiar el comportamiento térmico de la leche durante los tratamientos térmicos llevados a cabo se determinaron lactulosa, epilactosa, proteínas de suero no desnaturalizadas, furosina, fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa, como indicadores de la intensidad del calentamiento. Asimismo se llevaron a cabo recuentos de bacterias totales, estudio del grado de proteólisis y análisis sensorial con el fin de evaluar el período de vida útil de la leche procesada.

2.4.1. Determinación de lactulosa y epilactosa por cromatografía de gases

Se determinó el contenido en lactulosa y epilactosa de la leche calentada en discontinuo en microondas y convencionalmente siguiendo el método propuesto por Olano y col. (1986). Según este método 1 mL de leche se lleva hasta 10 mL con metanol con el fin de precipitar proteínas y grasa. Al cabo de una hora se filtran las muestras precipitadas y a 1 mL de la solución obtenida se le añade 1 mL de solución de patrón interno, fenil- β -glucósido al 1% en metanol/agua (70:30). Posteriormente se evapora a sequedad en rotavapor a temperatura ambiente y a continuación se añade, 0,1 mL de N-trimetilsilil imidazol como agente derivatizante, manteniéndolas en una estufa a 65°C durante media hora para favorecer la reacción. Una vez que se enfrían se añaden 0,1 mL de hexano y 0,2 mL de agua y se inyectan en el cromatógrafo de 0,2 a 1 μ L de la fase orgánica.

Los análisis cromatográficos de los trimetilsilil derivados de los carbohidratos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Sigma 3B (Perkin Elmer) equipado con detector de ionización de llama, utilizando una columna microrrellena con OV-17 al 2% sobre Volaspher A-2 120-140 mesh (Merck) desilanzado. Como gas portador se empleó nitrógeno a un flujo de 10 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C y la temperatura del horno programada de 200 a 270°C, con una velocidad de calentamiento de 15°C/min y tiempo inicial de 2 minutos. Los datos se recogieron en un integrador LCI-100 (Perkin-Elmer).

2.4.2. Determinación de proteínas de suero no desnaturalizadas mediante HPLC

El análisis de las proteínas de suero se realizó en la leche procesada con microondas y convencionalmente tanto en discontinuo como en continuo. En este último caso la leche fue de vaca y cabra. Se utilizó el método de Resmini y col. (1989), de acuerdo con el siguiente procedimiento: 50 mL de leche se llevan a un pH de 4,6 por adición de HCl 2N, manteniéndose a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se centrifuga la muestra a 4000 r.p.m. durante 20 minutos a

una temperatura de 5°C. El sobrenadante se filtra a través de papel Whatman n° 40 y se realizan distintas diluciones del suero con tampón fosfato 0,1 M pH 6,7, en función del tipo de leche procesada que se trate. Así, las diluciones que se realizan son: 1:2, 1:5 y 1:10 para leches estériles, UHT y pasterizadas, respectivamente. Por último, las muestras se filtran a través de membranas Acrodisc de 0,2 µm de tamaño de poro y se inyectan seguidamente en el cromatógrafo.

El sistema cromatográfico empleado fue un equipo Beckman compuesto de dos bombas programables modelo 126, un detector UV de longitud de onda variable modelo 166 y un inyector automático modelo 502 con un bucle de carga de 50 µL. Se utilizó una columna polimérica de fase reversa PLRP-S (Polymer Laboratories LTD) de 150 x 4,6 mm y 8 µm de tamaño de partícula. Los análisis se realizaron a 40°C, y la detección a 205 nm. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el System Gold 7.11 (Beckman). Para la elución se utilizó un gradiente binario de los siguientes eluyentes: TFA al 0,1% en agua y TFA al 0,1% en acetonitrilo. El flujo empleado fue de 1 mL/min.

La cuantificación se realizó por el método del patrón externo, calculando la ecuación de la recta correspondiente para cada una de las proteínas a partir de patrones comerciales.

En el caso de la leche de cabra se utilizó el mismo método, pero realizándose la preparación de las caseínas con HCl 2N a pH 4,2 y centrifugando posteriormente a 7000 r.p.m., todo ello encaminado a lograr una mayor precipitación de las caseínas para evitar su posible interferencia en el análisis cromatográfico de las proteínas de suero. La cuantificación se hizo mediante el cálculo de los porcentajes de desnaturalización respecto a la leche cruda, dado que no existían patrones comerciales de proteínas de suero caprinas.

2.4.3. Determinación de la furosina mediante HPLC

Para la determinación de furosina en las muestras de leche calentadas en discontinuo con microondas y convencionalmente se siguió el método de Delgado y col. (1992). El procedimiento a seguir es el siguiente: a 0,5 mL de leche se añaden 3 mL de HCl 7 N, resultando una normalidad de 6. Esta mezcla se hidroliza a 110°C durante 24 horas en tubos de hidrólisis cerrados a vacío. Los hidrolizados obtenidos se evaporan a sequedad en rotavapor a 40°C. El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua y se filtra a través de una membrana Anotec (Whatman) de 0,2 µm. El filtrado se pasa a través de un cartucho Sep-Pack C₁₈ (Millipore) previamente acondicionado con metanol y agua. Una vez eluida la muestra, se pasa una mezcla agua/acetonitrilo/ácido fórmico (95/5/0,2) para eluir la furosina que pudiera quedar retenida, hasta un volumen final de 5 mL.

El sistema cromatográfico consistió en una bomba modelo 510 (Waters Assoc.), un inyector Rheodyne modelo 7125 con un bucle de carga de 20 µL y un detector de longitud de onda variable SM 4000 (LDC Analytical), conectados a un sistema de tratamiento de datos System Gold 7.11 (Beckman). Se utilizó una columna Spherisorb ODS2 (Phenomenex) de 250 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas a temperatura ambiente y a una longitud de onda de detección de 280 nm. Como fase móvil se utilizó una solución de heptanosulfonato sódico 5 mM, y ácido fórmico al 0,2%, en agua/acetonitrilo 80:20.

El análisis cuantitativo de la furosina se llevó a cabo por el método del patrón externo y la recta correspondiente se realizó con disoluciones de patrones preparadas en el laboratorio mediante la adición de patrón puro de furosina a hidrolizados de leche cruda. La furosina patrón se obtuvo a partir de la hidrólisis del compuesto de Amadori ε-N-(1-desoxi-D-fructosil)-L-lisina, sintetizada en el laboratorio según el método de Finot y col. (1968).

2.4.4. Prueba de la fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó cualitativamente en las leches de vaca y cabra calentadas en continuo con microondas y convencionalmente mediante el método de Aschaffenburg y Mullen (1949). Según este método 5 mL de paranitrofenilfosfato disódico al 0,15% en tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM se colocan en tantos tubos de ensayo como muestras de leche procesada haya. También se preparan otros dos tubos con el reactivo, uno para leche cruda y otro para leche hervida. Los tubos tapados se colocan en un baño de agua a 37°C durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo se añade 1 mL de leche a cada uno ellos, se agitan vigorosamente y se incuban en el baño de agua durante 30 minutos. La leche cruda da color amarillo intenso (positivo) porque tiene la fosfatasa activa, sin embargo la leche hervida debe dar un color blanco (negativo) al inactivarse el enzima. En función de esto se puede evaluar la inactivación de la fosfatasa en las muestras de leche procesada.

El método descrito es válido para la leche de vaca, sin embargo en el caso de leche de cabra se utilizó la modificación de Williams (1986). El fundamento es el mismo, pero se emplean 3 mL de leche en lugar de 1 mL y el período de incubación es de 4 horas en lugar de 30 minutos.

2.4.5. Prueba de la lactoperoxidasa

La actividad de este enzima se determinó cuantitativamente en leche de vaca y cabra procesada en continuo mediante el método espectrofotométrico descrito por Shindler y col. (1976). Según este método a 25 μ L de leche se añaden 5 mL de ABTS en 0,1 M tampón acético-acetato pH 4,4. Esta mezcla se divide en dos volúmenes iguales. Uno de ellos sirve de control y al otro se le añaden 50 μ L de H₂O₂ 5 mM y se mide el incremento de absorbancia a 413 nm entre los tiempos de 50 y 200 segundos; en nuestro caso se ha utilizado un espectrofotómetro Lambda 2 (Perkin

Elmer) conectado a un ordenador Epson PC J1. El porcentaje de actividad lactoperoxidásica de cada muestra problema se obtiene refiriendo su incremento de absorbancia al valor obtenido para la leche cruda.

2.4.6. Recuento de bacterias totales

El recuento de bacterias totales en leche de vaca y cabra procesadas en continuo se realizó mediante el método de rutina, Marshall (1993). Las diluciones se hicieron en baptopeptona al 1% y las siembras en agar nutritivo al 2,35%. El período de incubación fue de 48 horas a 37°C.

2.4.7. Grado de proteolisis

En las leches en las que se estudió el período de vida útil el grado de proteolisis se determinó mediante:

a) Colorimetría, midiendo los grupos amino libres de la fracción soluble en TCA al 8 %, con TNBS según el método de McKellar (1981). Las medidas colorimétricas se realizaron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-120-01 y las absorbancias se convirtieron en μ moles de glicina utilizando patrones cuyas concentraciones fueron de 0,05 a 0,5 mM.

b) Análisis electroforético de las caseínas, separadas a pH 4,6, en PAGE-SDS. Las electroforesis se realizaron en placas (180 x 160 mm) de 0,7 mm de espesor. Se empleó la cubeta modelo SE 400 de Hoefer y la fuente de alimentación Hoefer modelo PS 500 XT (500 V, 400 mA y 200 W). La técnica que se siguió fue la de Laemmli (1970), siendo el gel de concentración de T= 4% y C= 2,7 % y un gel de resolución de T=15% y C= 2,7 %. Se utilizó un juego de patrones (Pharmacia), constituido por: fosforilasa B (94KD), albúmina (64KD), ovoalbúmina (43KD), anhidrasa carbónica (30KD), inhibidor de tripsina (20,1KD) y α -lactoalbúmina (14,4KD). Las bandas se

tiñeron con Azul de Coomassie R-250 (Winter y Anderson, 1977) y los geles se secaron entre dos láminas de celofán en un secador a vacío (Bio-Rad 443) a 40°C.

c) Análisis de la fracción soluble a pH 4,6 mediante el método Kjeldahl expresando los datos como % de nitrógeno no caseínico. Con objeto de ampliar el rango de compuestos con grupos amino libres presentes en la fracción soluble se siguió el método Kjeldahl, ya que por colorimetría siguiendo el método de McKellar sólo se pudieron detectar los aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular.

2.4.8. Análisis sensorial

Se realizaron pruebas triangulares según el método ISO Standard 4120 con 12 catadores experimentados. La comparación siempre se hizo entre leches sometidas a tratamientos similares de temperatura y tiempo, pero procedentes de sistemas de calentamiento distintos, bien microondas o bien pasterizador de placas. Los catadores dispusieron de dos tríos de muestras, en cada uno de los cuales existía una muestra diferente a las otras dos, elegida al azar.

También se llevaron a cabo pruebas de preferencias en las que los catadores debían otorgar a las muestras, una calificación comprendida entre 1 y 9, correspondiendo la más alta a la que presentara las mejores características organolépticas de acuerdo a sus preferencias.

En todos los casos los catadores dispusieron de 20 mL de leche en cada vaso. En la figura 13 se muestran los modelos de fichas empleadas en el análisis sensorial.

ANALISIS SENSORIAL

NOMBRE:

FECHA:

PRUEBA TRIANGULAR

En cada trío de muestras presentadas, dos de las tres muestras son iguales y otra diferente.

Pruebe las muestras de izquierda a derecha, anote las claves en ese orden y señale con un círculo la que considere diferente.

TRIO A

TRIO B

¿Le ha parecido difícil la prueba? ¿Por qué?

PRUEBA DE PREFERENCIAS

Pruebe las muestras del dúo presentado y clasifíquelas en la siguiente escala:

Clave de muestras	-----	-----
1.- Me gusta muchísimo	-----	-----
2.- Me gusta mucho	-----	-----
3.- Me gusta moderadamente	-----	-----
4.- Me gusta, aunque poco	-----	-----
5.- Ni me gusta, ni me disgusta	-----	-----
6.- Me desagrada ligeramente	-----	-----
7.- Me desagrada bastante	-----	-----
8.- Me desagrada mucho	-----	-----
9.- Me desagrada absolutamente	-----	-----

Observaciones:

Figura 13. Modelo de fichas empleadas en el análisis sensorial de la leche pasterizada.

2.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Para el análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó el programa Statgrafics Statistical System Software v 5.0. (1991).

Los análisis de regresión lineal se han llevado a cabo mediante el programa 1R del paquete estadístico BMDP/DYNAMIC v 7.0 (1992).

La validación del modelo matemático propuesto se realizó según el procedimiento de "dejar uno fuera" y se calculó el valor del error estándar de predicción (Sharaf y col., 1986) mediante el programa 9R del paquete estadístico BMDP/DYNAMIC v 7.0 (1992).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. TRATAMIENTOS EN DISCONTINUO

3.1.1. Puesta a punto del equipo

El tipo de horno en el que se han llevado a cabo los tratamientos térmicos con microondas es un sistema multirresonante. Mediante dicho diseño, se crea un campo electromagnético que no es totalmente uniforme por lo que es necesario caracterizarlo y establecer las condiciones que permitan, en la medida de lo posible, tratamientos térmicos precisos.

Por otra parte, este equipo estaba destinado a realizar digestiones por lo que fue necesario hacer un estudio sobre las posibilidades de su utilización como un horno de calentamiento controlado en condiciones más suaves que las habitualmente empleadas en la digestión de muestras.

En primer lugar, se comprobó la potencia del magnetrón (Copson, 1975). La casa comercial indicó que dicha potencia era 600 W, sin embargo experimentalmente resultó ser 532 W.

Asimismo, se realizó la calibración de la sonda de temperatura del horno microondas, pudiéndose comprobar que las temperaturas registradas no variaban con respecto a las obtenidas con un termómetro de resistencia de platino. Las lecturas fueron reproducibles siempre que la sonda estuviera introducida en la muestra más de 1 cm.

Los tratamientos térmicos de prueba (120°C, 20 minutos) se realizaron al 100% de potencia en el magnetrón, ya que a menor potencia puede alargarse la rampa de calentamiento y aumentar las oscilaciones de temperatura incrementando el riesgo de sobrecalentamiento en las muestras (Nikdel y col., 1993). El indicador térmico

utilizado fue la lactulosa.

El estudio realizado sobre la influencia del volumen de muestra en el calentamiento con microondas puso de manifiesto que volúmenes inferiores a 25 mL de leche no permitían controlar adecuadamente el proceso, dando lugar a sobrecalentamientos que originaban pardeamientos excesivos e incluso carbonizaciones apreciables y desestabilización de la leche. Esto se debe a que los volúmenes elegidos no eran los adecuados para la potencia seleccionada (Schiffmann, 1986). En los ensayos sucesivos el volumen de leche utilizado fue de 25 mL.

A continuación, estudiamos la influencia del número de recipientes y su posición en el soporte giratorio dentro del horno microondas, así como la situación de la sonda de temperatura en los recipientes, en la precisión de los calentamientos (ensayos A, B, C, D, E, F, G, H, I). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3, mostrándose en las tablas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 todos los datos individuales de cada ensayo.

Tabla 3. Influencia de diferentes parámetros (nº de recipientes, posición de los mismos y de la sonda) en la formación de lactulosa durante el calentamiento de leche con microondas a 120°C durante 20 minutos.

<i>Ensayos</i>	<i>Repeticiones</i>	<i>Nº recipientes</i>	<i>Posición recipientes*</i>	<i>Posición Sonda T</i>	<i>Lactulosa</i>	
					\bar{x} (mg/100mL)	<i>DSR</i> (%)
A	3	4	1,3,6,9	1	157,3	27,2
B	2	3	1,3,9	1	190,4	28,0
C	3	6	1,3,6,8,9,11	1	148,6	27,7
D	3	6	2,4,5,7,10,12	2	137,2	24,9
E	3	3	1,5,9	Variable	189,2	17,3
F	3	3	2,6,10	Variable	147,1	34,8
G	3	3	3,7,11	Variable	140,0	24,9
H	3	3	4,8,12	Variable	170,8	33,7
I	7	2	1,7	1	194,4	9,6

* Ver figura 4, apartado 2.2.1.1..

Tabla 4. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa a 120°C 20 minutos con microondas en el ensayo A.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>			\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	3	6	9		
A1	112,4	166,4	181,4	153,4	23,6
A2	95,5	185,4	177,3	152,8	32,6
A3	110,3	161,3	226,1	165,9	35,0
\bar{x} (mg/100mL)	106,1	171,1	194,9		
DSR(%)	8,7	7,4	13,9		

Tabla 5. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa a 120°C 20 minutos con microondas en el ensayo B.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>			\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	1	3	9		
B1	164,7	156,4	255,6	192,2	28,6
B2	174,8	132,8	258,4	188,7	33,8
\bar{x} (mg/100mL)	169,7	144,6	257,0		
DSR(%)	4,2	11,5	0,8		

Tabla 6. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo C.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>						\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	1	3	6	8	9	11		
C1	151,4	161,3	177,1	106,3	123,1	178,1	149,5	19,6
C2	150,2	140,7	136,4	86,7	81,5	169,6	127,5	27,8
C3	171,8	178,7	198,3	106,2	115,1	242,3	168,8	30,4
\bar{x} (mg/100mL)	157,8	160,2	170,6	99,7	106,6	197,7		
DSR(%)	7,7	11,9	18,4	11,3	20,7	20,2		

Tabla 7. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo D.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>						x (mg/100mL)	DSR (%)
	2	4	5	7	10	12		
D1	150,4	102,5	138,9	177,5	173,3	143,1	147,6	18,4
D2	161,1	99,1	108,1	189,9	180,1	154,2	148,8	25,1
D3	115,1	70,0	95,0	136,0	160,1	116,1	114,8	27,6
x (mg/100mL)	142,2	90,5	114,0	167,8	171,2	137,8		
DSR(%)	16,9	19,7	19,8	16,8	5,9	14,2		

Tabla 8. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo E.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>			\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	1	5	9		
E1	175,3	170,5	204,3	183,3	10,0
E2	247,5	175,5	207,8	210,3	17,1
E3	209,7	131,2	181,4	174,1	22,8
\bar{x} (mg/100mL)	210,0	159,1	197,8		
DSR	17,1	15,2	7,2		

Tabla 9. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo F.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>			\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	2	6	10		
F1	158,0	115,1	174,4	149,2	20,6
F2	43,9	189,6	97,9	110,5	66,7
F3	202,3	173,7	168,8	181,6	10,0
\bar{x} (mg/100mL)	134,7	159,5	147,0		
DSR	60,6	24,6	29,0		

Tabla 10. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo G.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>			\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	3	7	11		
G1	188,4	130,4	169,1	162,7	18,2
G2	120,3	134,3	109,3	121,3	10,4
G3	193,6	111,7	102,6	136,0	36,9
\bar{x} (mg/100mL)	167,4	125,5	127,0		
DSR(%)	24,4	9,6	28,8		

Tabla 11. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo H.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>			\bar{x} (mg/100mL)	DSR (%)
	4	8	12		
H1	134,7	110,1	120,2	121,6	10,2
H2	122,2	190,2	196,2	169,5	24,3
H3	293,2	195,7	175,2	221,4	28,5
\bar{x} (mg/100mL)	183,4	165,3	163,9		
DSR	52,0	29,0	23,9		

Tabla 12. Influencia de la posición de los recipientes en la formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de leche a 120°C 20 minutos en horno microondas en el ensayo I.

<i>Ensayo</i>	<i>Posición</i>		\bar{x} (mg/100mL)	DSR(%)
	1	7		
I1	175,1	180,8	178,0	2,2
I2	174,4	161,8	168,1	5,3
I3	198,5	215,9	207,2	6,0
I4	197,9	198,7	198,3	0,3
I5	195,7	221,5	208,6	8,8
I6	214,9	219,4	217,2	1,5
I7	179,7	187,4	183,6	3,0
\bar{x} (mg/100mL)	190,9	197,9		
DSR(%)	7,9	11,4		

Se puede comprobar la alta variabilidad encontrada en cuanto a la precisión de resultados. Los valores de DSR fueron elevados en la mayor parte de los ensayos realizados. La DSR resultó ser, en general, inferior en las repeticiones de calentamiento (para una misma posición) que las repeticiones de las muestras (en distinta posición) para un mismo ensayo de calentamiento.

En el caso de los ensayos C y D dos parejas de recipientes (figura 4, apartado 2.2.1.1.) se colocaron en posiciones contiguas (8,9 y 4,5, respectivamente). Los resultados encontrados, en cuanto al contenido en lactulosa se refiere, fueron inferiores al resto de las posiciones estudiadas, lo cual implica la existencia de fenómenos de apantallamiento entre recipientes contiguos que da lugar a una menor concentración de las microondas en dichos recipientes y en consecuencia la temperatura alcanzada en los mismos es inferior.

Debido a que el valor de DSR correspondiente al ensayo I (2 recipientes, posiciones 1 y 7 y posición de la sonda en 1) era el menor se decidió elegir las condiciones empleadas en dicho ensayo para llevar a cabo tratamientos térmicos posteriores.

Como se ha podido comprobar, por los resultados expuestos, dentro del horno microondas no existe una distribución homogénea de la energía, a pesar de estar provisto de una serie de dispositivos diseñados con el fin de mejorar la uniformidad de la energía en el interior del equipo. Por ello, resulta bastante difícil realizar calentamientos precisos. Este aspecto ha sido observado con anterioridad por otros autores, así, Hayward y Kropf (1980) comprobaron que, durante la determinación de la humedad en leche mediante microondas, existían zonas en el interior del horno con una mayor susceptibilidad para originar, tanto sobrecalentamientos de la muestra como, por el contrario, calentamientos insuficientes de la misma.

3.1.2. Gradiente de temperatura en el interior de la muestra

Con objeto de estudiar la variación de la temperatura en el interior de la muestra durante el tratamiento térmico de leche con microondas en discontinuo, se llevaron a cabo calentamientos al 100% de potencia realizando las medidas de la temperatura en 15 posiciones distintas de la muestra, tal y como se indica en la figura 14.

A partir de los datos experimentales se realizó un análisis de regresión lineal múltiple con el fin de obtener un modelo matemático que permitiera estimar la variación de la temperatura (T) en función del tiempo de tratamiento (t), la profundidad (p) y la distancia axial al eje central (d). Para ello se utilizaron estos tres parámetros, sus cuadrados y los productos entre ellos según el siguiente polinomio de segundo grado:

$$T = a + b_1t + b_2p + b_3d + b_4t^2 + b_5p^2 + b_6d^2 + b_7tp + b_8td + b_9pd + b_{10}tpd \quad (1)$$

siendo a, la ordenada en el origen y b_i los coeficientes de regresión de los parámetros.

En la tabla 13 se muestran los valores correspondientes a la regresión lineal y, como se puede observar, a y los coeficientes de d , t^2 , td , pd y tpd no son significativamente distintos de 0, por lo cual dichos términos no deben incluirse en el polinomio, resultando la siguiente ecuación de segundo grado:

$$T = 2,78t + 17,80p - 5,11p^2 - 3,02d^2 - 0,36tp (\pm 3,35) \quad (2)$$

El modelo propuesto presenta un coeficiente de determinación de 0,959 y los residuos están distribuidos al azar alrededor de su valor medio y son independientes del valor de la variable dependiente (T) (figura 15).

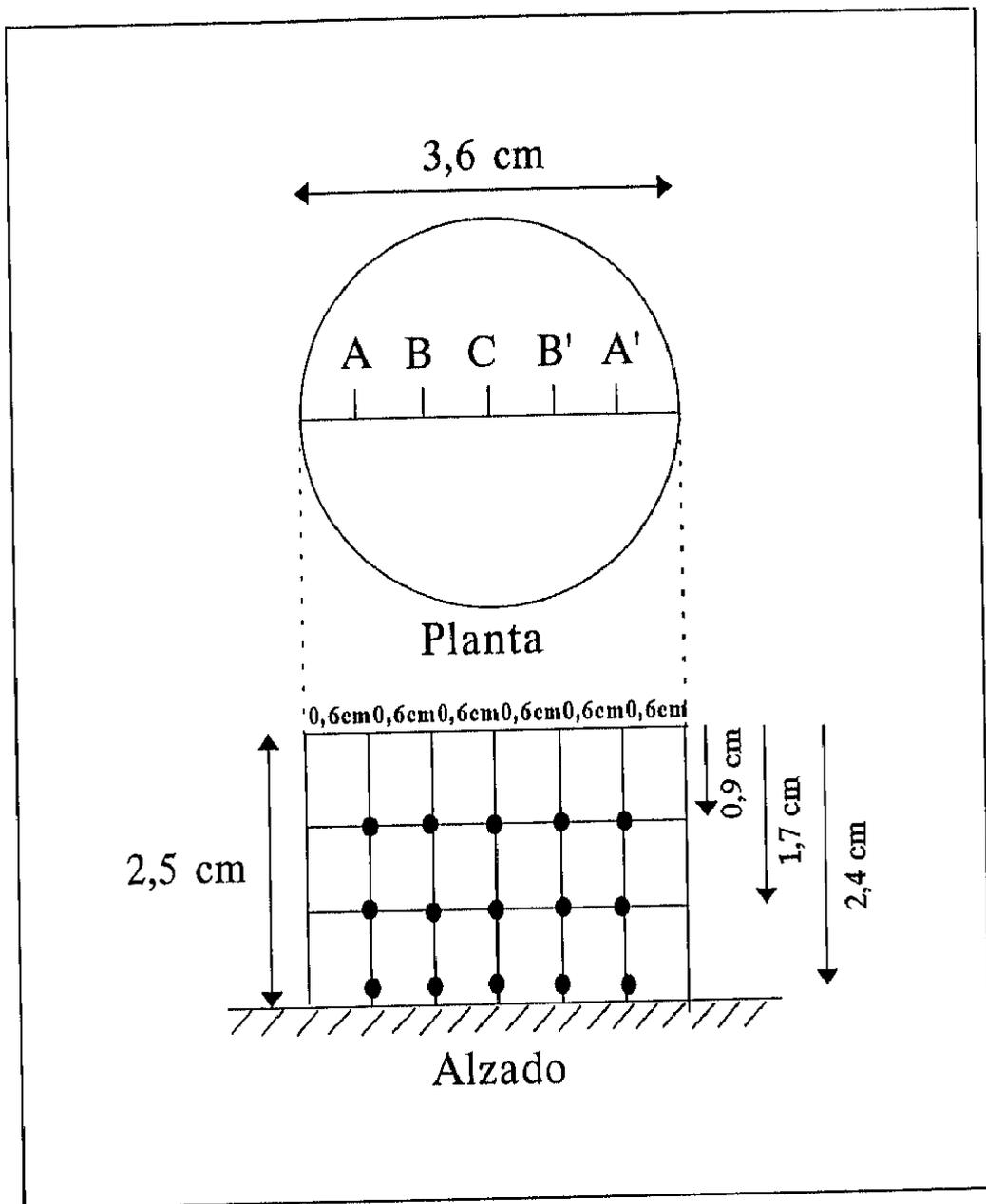


Figura 14. Representación de las posiciones de toma de temperatura en el interior de la muestra, tanto en profundidad (0,9, 1,7 y 2,4 cm) como a nivel axial (A, B, C, B' y A'), durante el tratamiento térmico de leche en el horno microondas.

Tabla 13. Datos de la regresión lineal de la temperatura en función del tiempo de tratamiento (t), profundidad (p) y distancia axial (d). (Grados de libertad = 3).

<i>Variable</i>	<i>Coefficiente regresión</i>	<i>P</i>
t	2,784	0,000
p	17,796	0,000
d	-0,958	0,621*
t ²	-0,002	0,535*
p ²	-5,109	0,000
d ²	-3,020	0,000
tp	-0,362	0,000
td	0,008	0,934*
pd	0,280	0,791*
tpd	0,034	0,485*
Ordenada origen (a)	-0,449	0,865*

*El coeficiente de regresión no es distinto de cero con $P < 0,001$

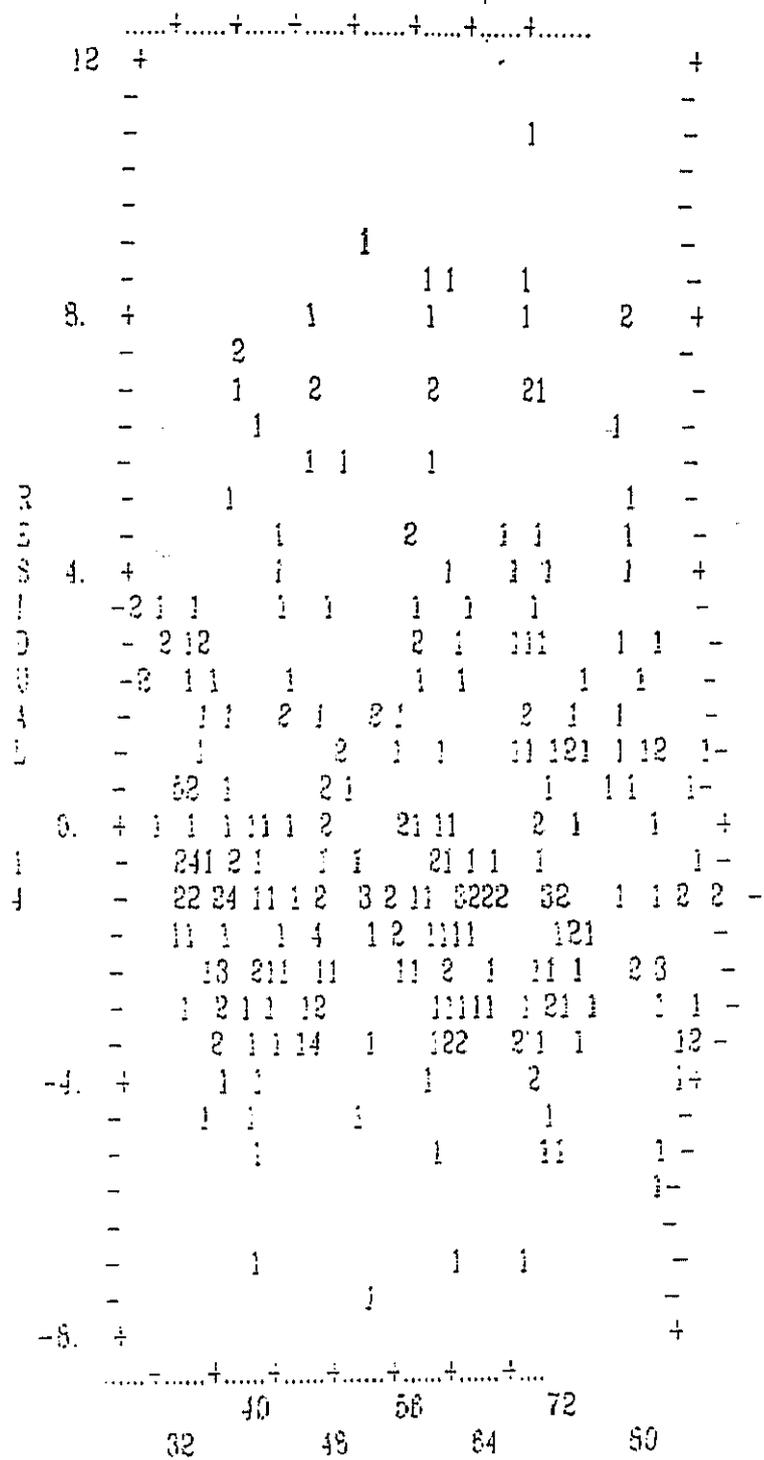


Figura 16. Distribución de los residuos correspondientes al polinomio de segundo grado (2).

La ecuación (2) estima el valor de la temperatura en el interior de la muestra con un error de $\pm 3,35^{\circ}\text{C}$ (error de estimación). También se ha podido calcular el error de predicción cuyo valor es de $3,39^{\circ}\text{C}$, muy próximo al anterior.

Por todo ello se puede asumir que el modelo matemático mostrado es adecuado para estimar y predecir la temperatura de la leche en cualquier punto de la muestra, en función del tiempo de tratamiento, profundidad y distancia axial.

Utilizando dicho modelo matemático para cada uno de los tiempos de calentamiento se obtuvieron curvas de nivel en las cuales se representa la temperatura en función de la profundidad y de la distancia axial. Las figuras 16 y 17 muestran las curvas de nivel correspondientes a 10 y 30 segundos de tratamiento.

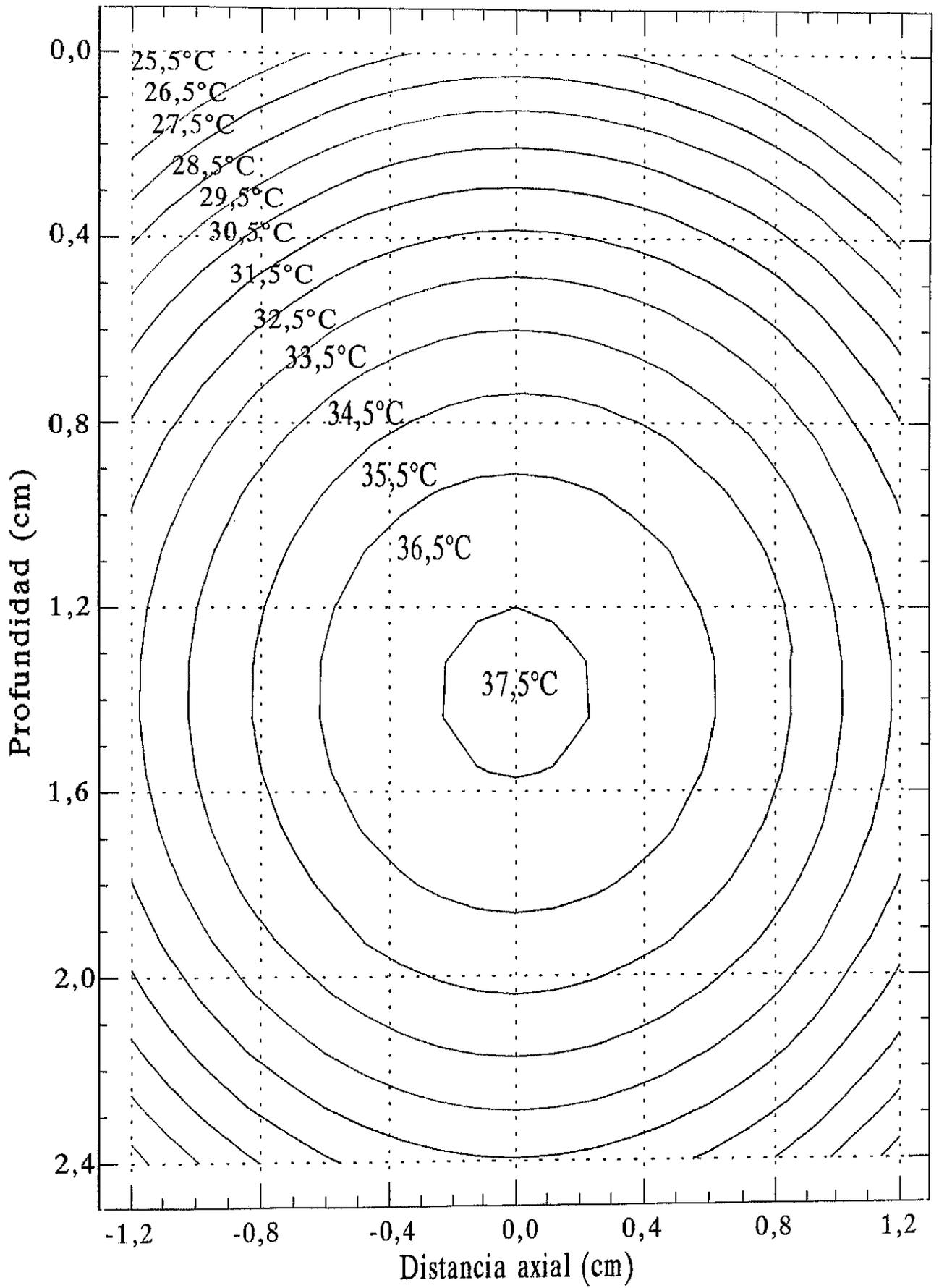


Figura 16. Curvas de nivel de la temperatura en función de la profundidad y la distancia axial, correspondientes al calentamiento de leche con microondas en discontinuo durante 10 segundos.

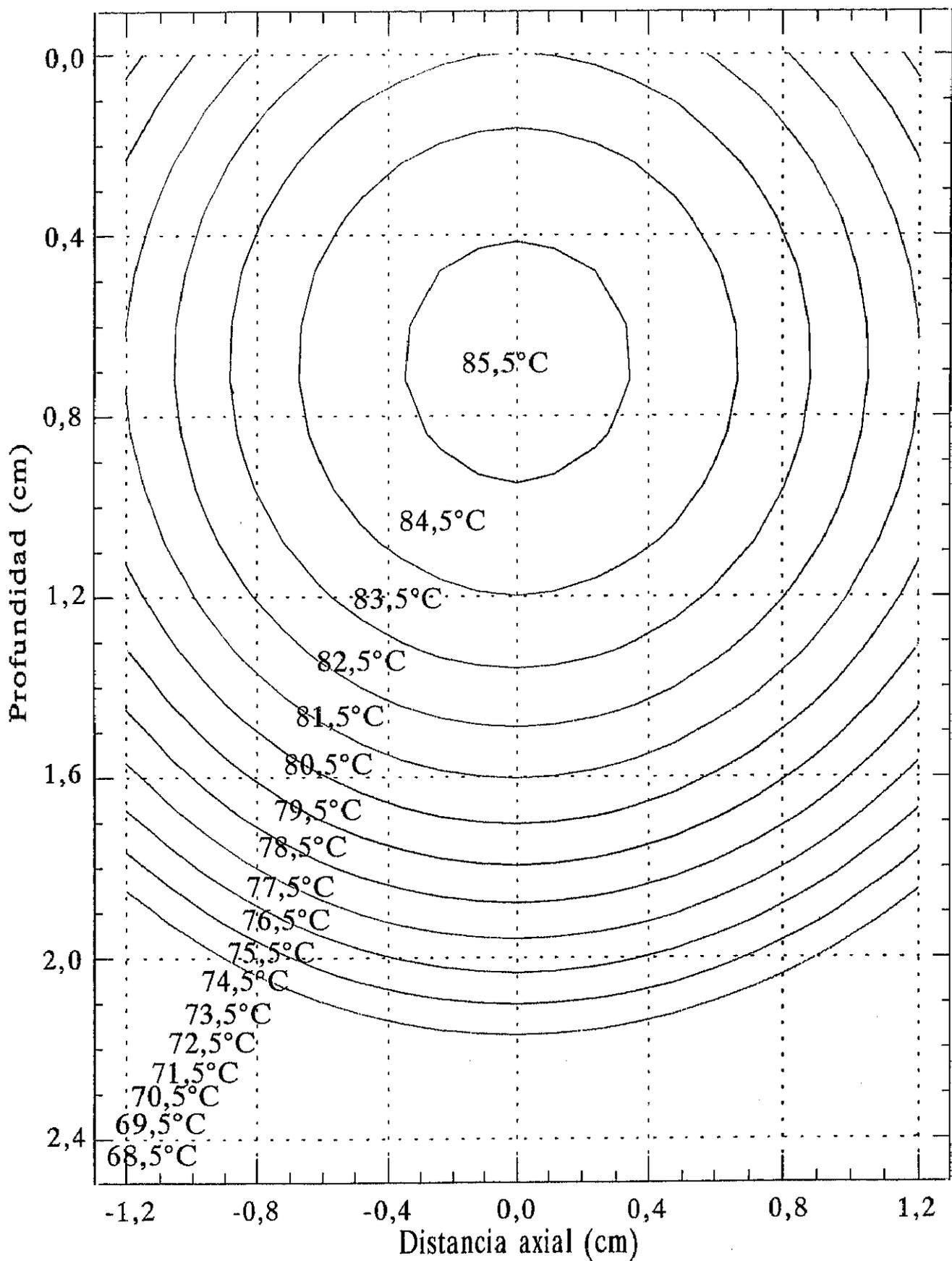


Figura 17. Curvas de nivel de la temperatura en función de la profundidad y la distancia axial, correspondientes al calentamiento de leche con microondas en discontinuo durante 30 segundos.

Como puede observarse en estas gráficas, cuando el calentamiento es de 10 segundos el centro del cilindro de muestra es la zona más caliente, y conforme aumenta el tiempo de tratamiento, el mayor calentamiento se produce en el eje central, en la zona más próxima a la superficie. Este hecho puede deberse a que en recipientes cilíndricos de pequeño diámetro se produce un efecto de convergencia o enfoque de la energía en el centro de la muestra (Mudgett, 1986; Prosetya y Datta, 1991). A medida que transcurre el tiempo se producen fenómenos de transmisión de calor por convección y la zona de mayor calentamiento se desplaza a lo largo del eje central hacia la superficie, disminuyendo el gradiente entre el centro y la superficie y aumentando entre el centro y el fondo.

Todo esto indica que, en la muestra, en dirección axial, existen diferentes velocidades de calentamiento a distintas profundidades y que dicha velocidad es mayor en la superficie que en el centro y en éste que en el fondo. Este hecho puede constatarse también, mediante las rectas de regresión de la temperatura frente al tiempo obtenidas mediante la ecuación (2) para los ejes A, B y C en cada una de las profundidades estudiadas (no se incluyen A' y B' por ser simétricos con A y B, respectivamente). En las figuras 18, 19 y 20 se representan dichas rectas con el intervalo de confianza para una seguridad del 95%. En la tabla 14, se exponen los valores del coeficiente de regresión (b) y de la ordenada en el origen (a) de dichas rectas. Como puede apreciarse, en los datos correspondientes a los tres ejes, la ecuación que presenta un mayor coeficiente de regresión es la de la superficie, siendo la ecuación de la zona del fondo la que posee un menor valor, debido a que las microondas llegan más difícilmente al fondo del recipiente (Prosetya y Datta, 1991). Cabe destacar también que la velocidad de calentamiento no depende de la distancia radial, ya que, a una misma profundidad el valor del coeficiente de regresión es el mismo en los tres ejes estudiados, excepto en el C a 1,7 cm de profundidad. Esto último viene a corroborar lo comentado anteriormente acerca del efecto de convergencia de la energía en el centro de la matriz a calentar, durante el tratamiento con microondas en discontinuo utilizando recipientes cilíndricos de pequeño diámetro (Mudgett, 1986; Prosetya y Datta, 1991).

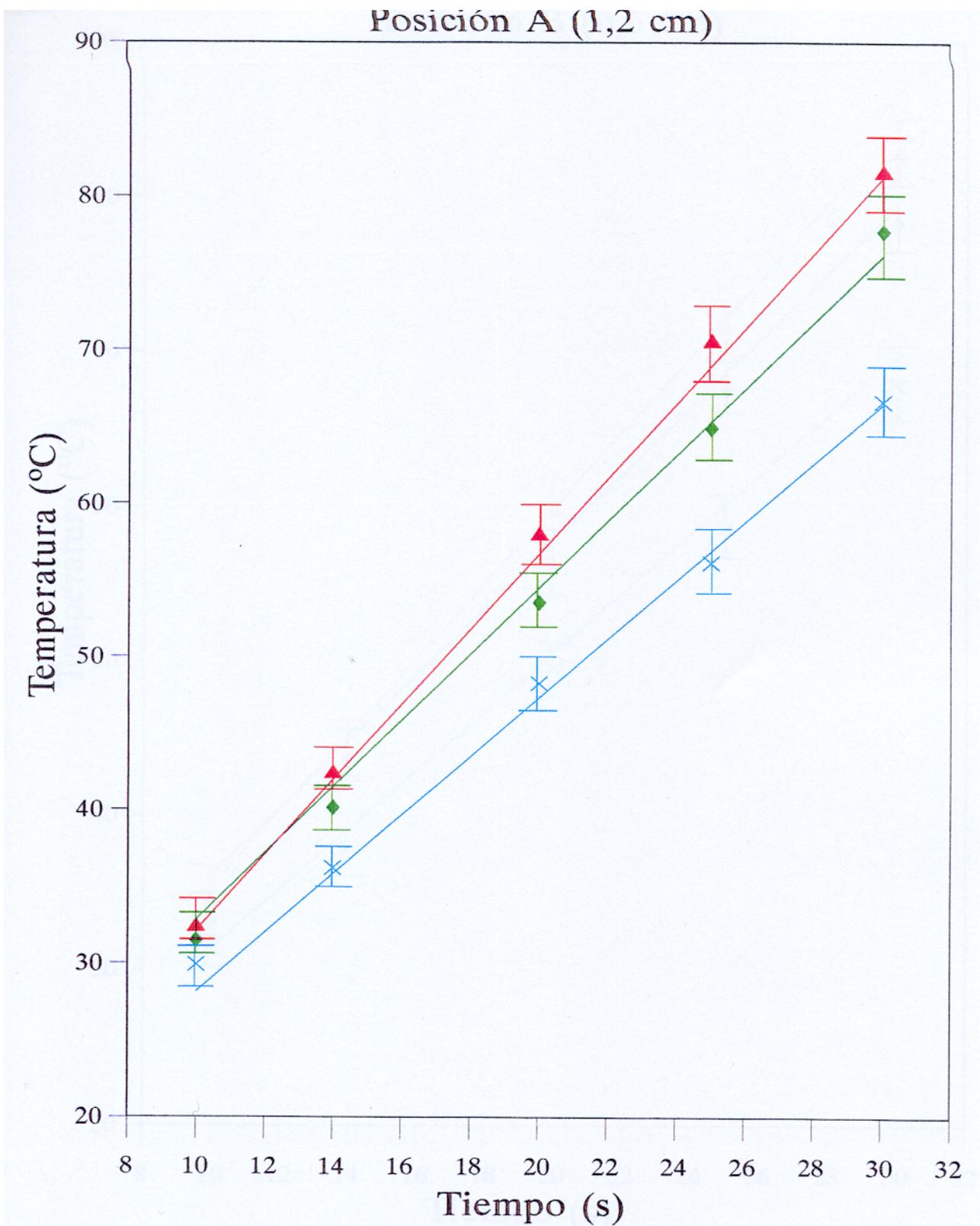


Figura 18. Regresión lineal de la temperatura frente al tiempo de calentamiento para el eje A a las tres profundidades estudiadas.(◆ Centro,▲ Superficie,× Fondo)

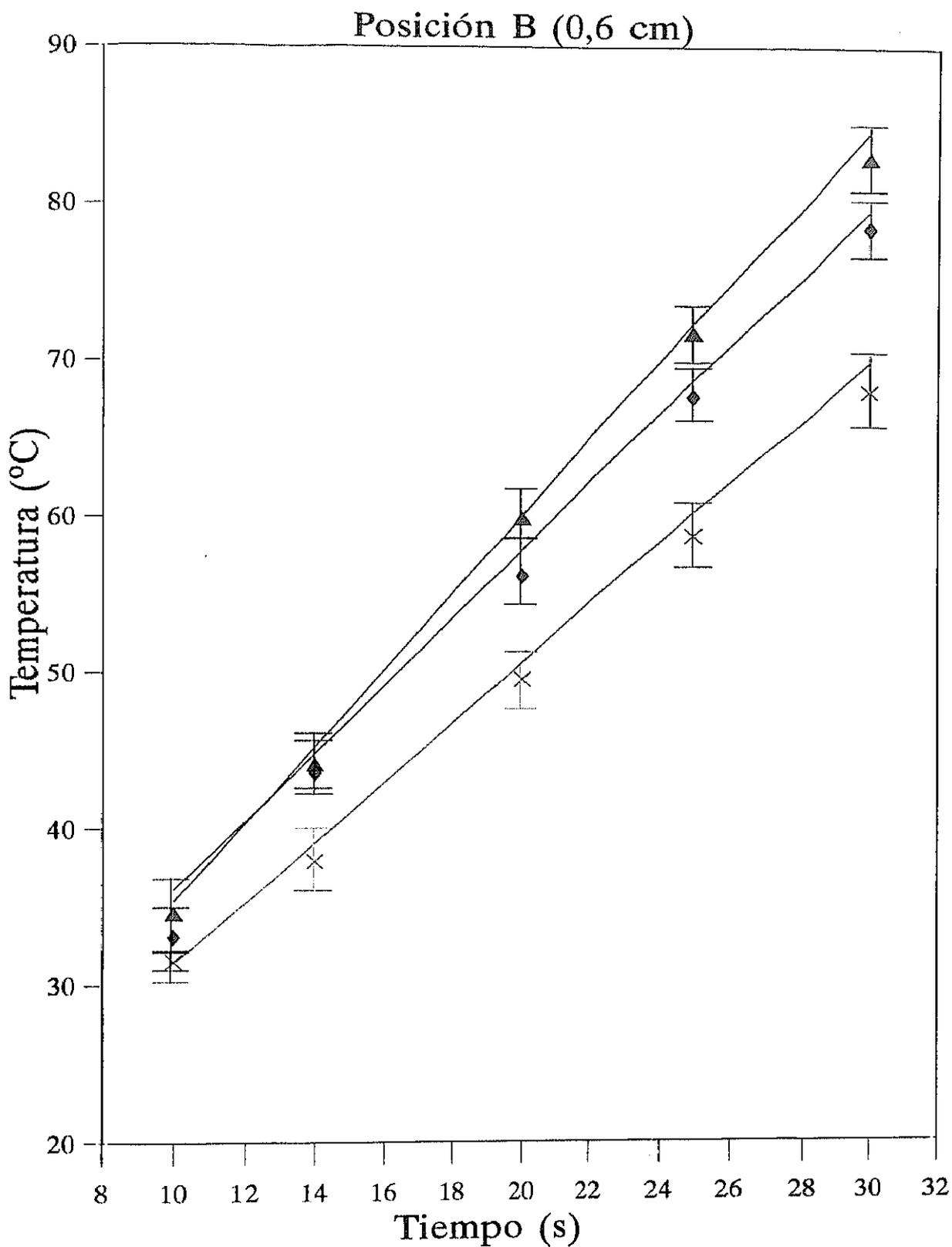


Figura 19. Regresión lineal de la temperatura frente al tiempo de calentamiento para el eje B a las tres profundidades estudiadas. (◆ Centro, ▲ Superficie, × Fondo)

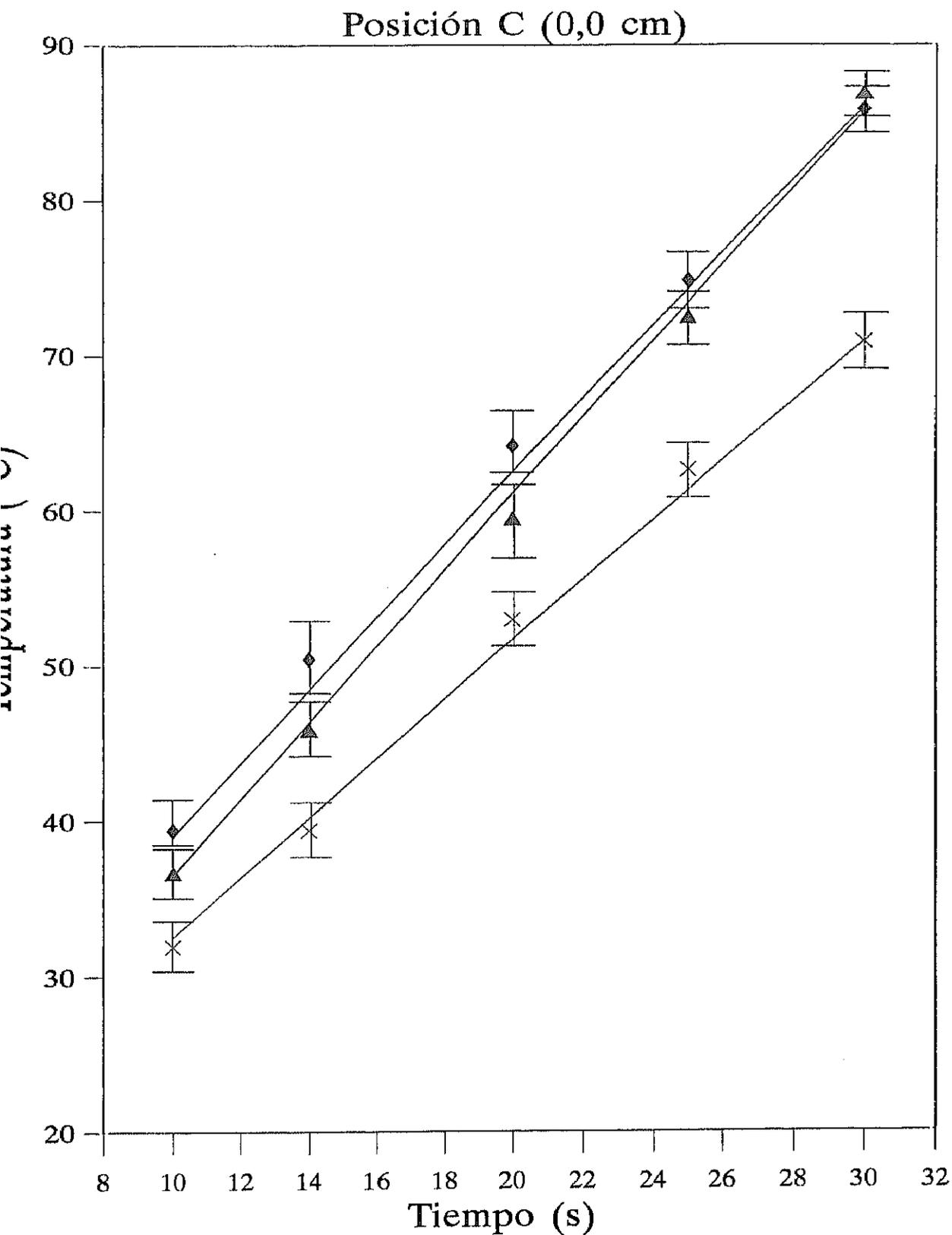


Figura 20. Regresión lineal de la temperatura frente al tiempo de calentamiento para el eje C a las tres profundidades estudiadas. (◆ Centro, ▲ Superficie, × Fondo)

Tabla 14. Rectas de regresión de temperatura frente a tiempo ($T = bt + a$) para los ejes A, B y C.

<i>Eje</i>	<i>Profundidad (cm)</i>					
	0,9		1,7		2,4	
	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
A	2,46	7,53	2,17	11,14	1,92	8,94
B	2,46	10,79	2,17	14,41	1,92	12,20
C	2,46	11,88	2,35	15,49	1,92	13,29

b: coeficiente de regresión

a: ordenada en el origen

Por los resultados obtenidos se puede considerar que, durante el calentamiento de leche con microondas en discontinuo se originan gradientes importantes de temperatura en el interior de la muestra y que es posible aplicar un polinomio de segundo grado como modelo matemático para estimar y predecir la variación de la temperatura existente.

3.1.3. Influencia de los componentes lácteos mayoritarios en el calentamiento de la leche por microondas

La composición de un alimento determina en gran medida las propiedades físicas del mismo y por tanto el modo de absorción y transmisión de la energía cuando se calienta mediante microondas (Ohlsson, 1990). Por ello, es un factor a considerar durante los tratamientos con microondas.

En la bibliografía no existen datos referentes a la contribución de los diferentes componentes lácteos en la precisión de los calentamientos con microondas en discontinuo, por ello se llevaron a cabo calentamientos de este tipo en muestras de leche entera, desnatada, concentrado de proteínas, permeado y tampón fosfato con lactosa. La evaluación del deterioro producido en las muestras como consecuencia del tratamiento térmico por microondas se realizó mediante la determinación de lactulosa.

En la figura 21 se representan las tres gráficas correspondientes a la formación de lactulosa, en cuatro de los cinco tipos de muestra estudiados, los resultados son los valores medios con los intervalos de confianza (seguridad del 95%). Los datos resultantes del calentamiento del tampón fosfato se muestran en la tabla 15.

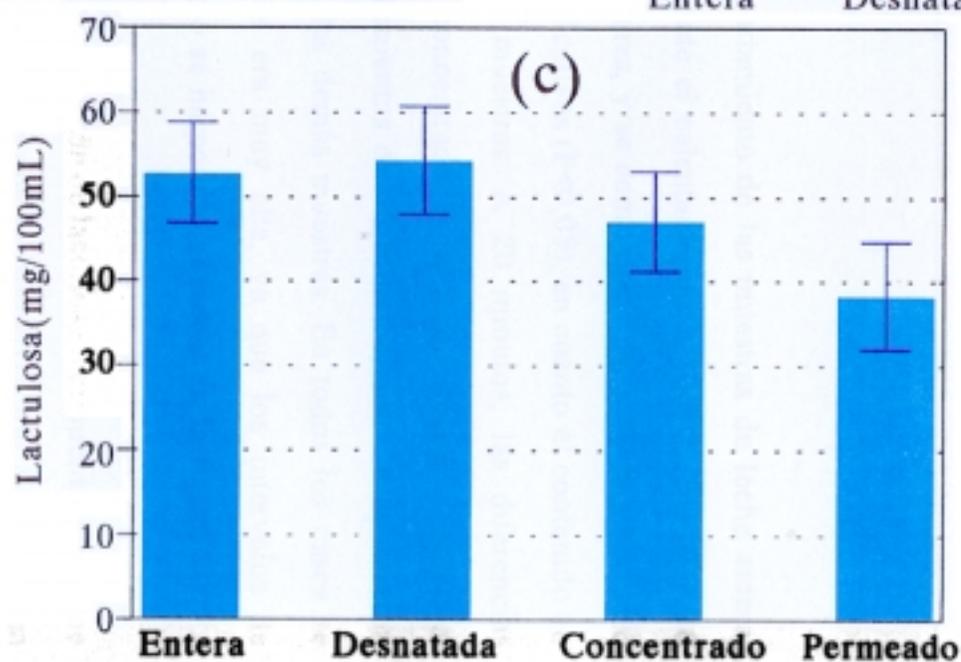
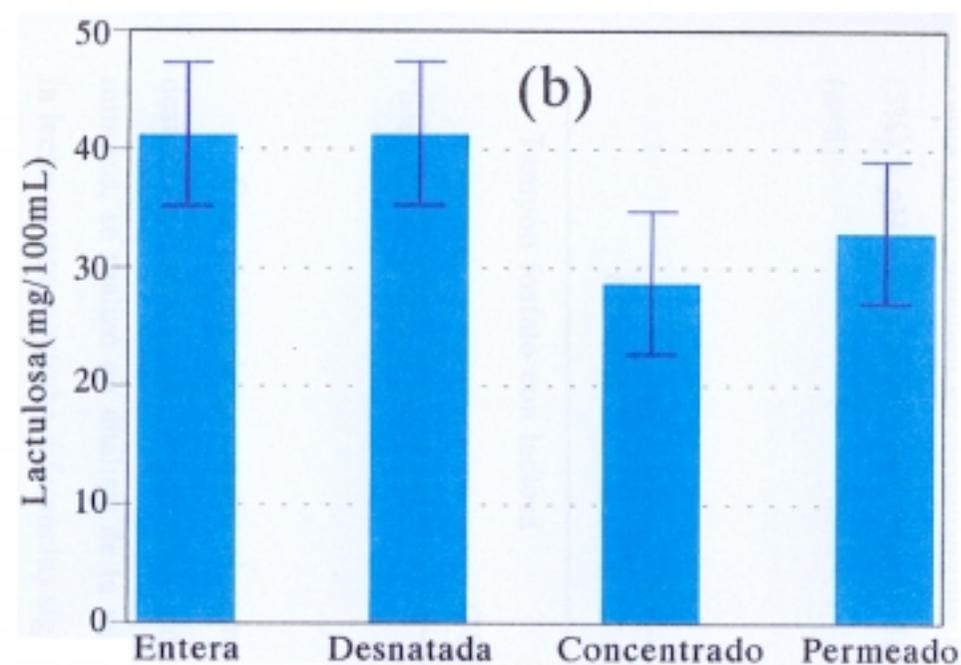
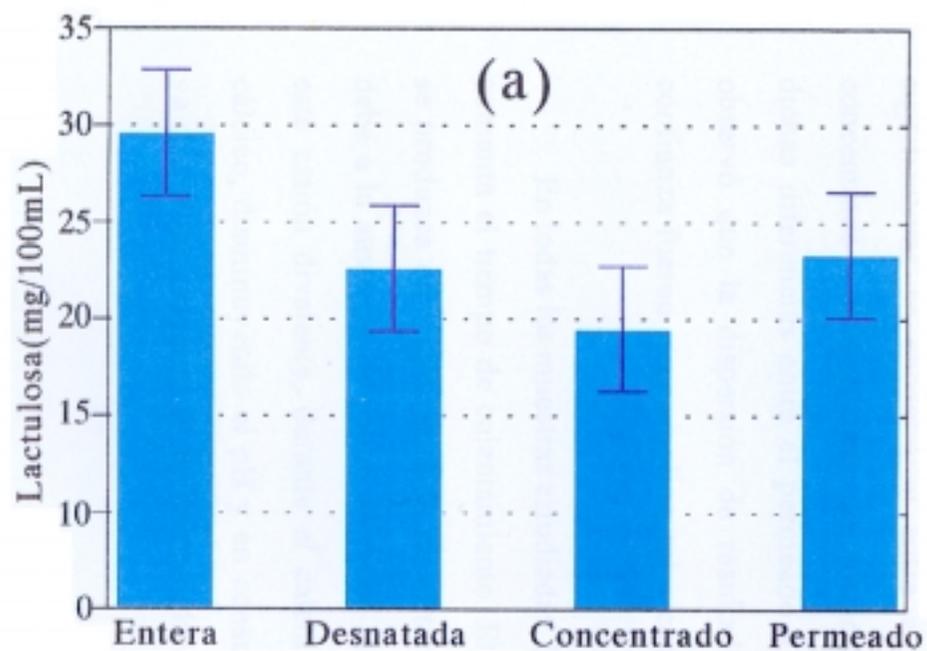


Figura 21. Contenido en lactulosa (mg/100mL) de diferentes tipos de muestras calentadas con microondas a 100°C durante 10(a), 20(b) y 30(c) minutos, (n=8).

Tabla 15. Contenido en lactulosa (mg/100mL) del tampón fosfato 0,1 M con lactosa (5%) y pH 6,8 calentado con microondas en discontinuo durante 10, 20 y 30 minutos (n=8).

<i>Muestra</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>		
	10	20	30
Tampón fosfato con lactosa	107,1 (88,6-125,7)*	134,2 (116,8-151,5)*	217,8 (199,2-236,3)*

*Intervalos de confianza para $P < 0,05$

Con objeto de comparar el comportamiento de las muestras de leche entera, desnatada, concentrado y permeado durante el calentamiento a 100°C, 10, 20 y 30 minutos, se realizó un análisis de la varianza, y se comprobó que, a 10 minutos sólo la leche entera mostraba diferencias significativas ($P < 0,05$), en cuanto al contenido en lactulosa, con respecto al resto de las muestras. A 20 minutos, las diferencias significativas se encontraron entre el concentrado y la leche entera y entre el concentrado y la desnatada. En los tratamientos de 30 minutos, sólo se apreciaron dichas diferencias entre el permeado y las demás muestras. En todos los casos se observó que la dispersión de resultados era muy alta, ya que los intervalos de confianza fueron muy amplios, tal y como se ha podido observar en la figura 21.

En todas las muestras estudiadas, la formación de lactulosa incrementa conforme aumenta el tiempo de calentamiento. El hecho de que la isomerización de la lactosa se produzca en mayor medida en el tampón fosfato que en el resto de muestras, se debe a la ausencia de calcio en dicho tampón. En leche y en sistemas que contengan este catión divalente, durante el calentamiento se forma un precipitado de fosfato cálcico, disminuyendo el pH y en consecuencia, la formación de lactulosa es menor, ya que dicha reacción se ve favorecida a pH básico (Jennes y Koops, 1962).

El análisis de la varianza de las medias de las DSR (figura 22) mostró que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los diferentes tipos de muestras ensayadas, siendo las DSR (valores medios) muy altos y los intervalos de confianza muy amplios. Esto podría indicar que, durante el tratamiento con microondas en discontinuo en nuestro equipo la variabilidad es muy alta e independiente de la composición de la leche y es bastante difícil lograr una buena precisión en los calentamientos. En cualquier caso, el posible efecto de la composición en el comportamiento térmico del producto, debe ser inferior al rango de variación observado en los repeticiones de las muestras ensayadas.

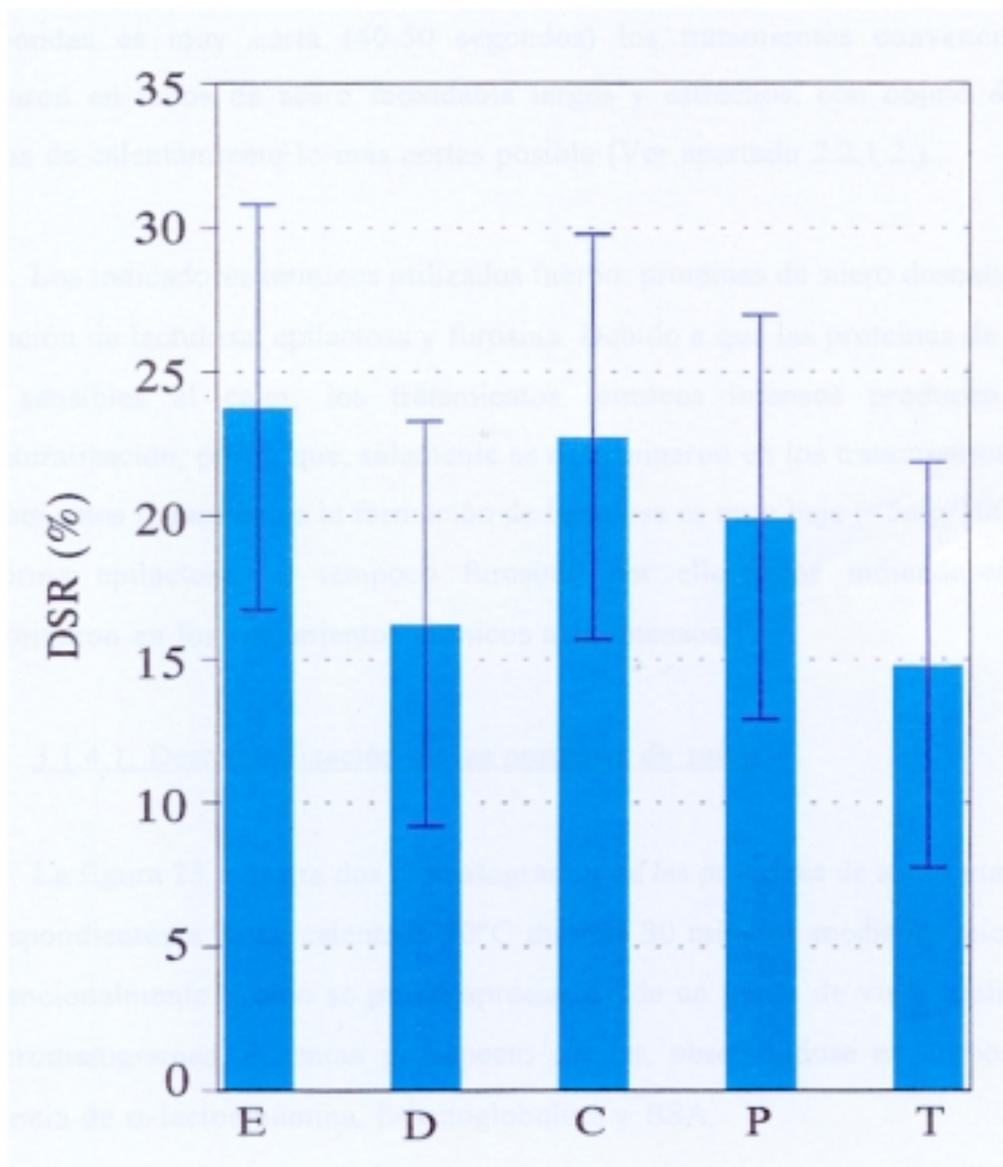


Figura 22. Valores medios de DSR(%) para la formación de lactulosa en leche entera (E), desnatada (D), concentrado (C), permeado (P) y tampón fosfato con lactosa (T) calentados con microondas a 100°C durante 10, 20 y 30 minutos (n=24).

3.1.4. Comparación de calentamientos de leche por microondas y convencionales

Con objeto de comparar el efecto producido en los componentes lácteos se realizaron, en paralelo, calentamientos con microondas y calentamientos convencionales. Dado que la rampa de calentamiento en los tratamientos térmicos con microondas es muy corta (40-50 segundos) los tratamientos convencionales se realizaron en tubos de acero inoxidable largos y estrechos, con objeto de obtener rampas de calentamiento lo más cortas posible (Ver apartado 2.2.1.2.).

Los indicadores térmicos utilizados fueron: proteínas de suero desnaturalizadas, formación de lactulosa, epilactosa y furosina. Debido a que las proteínas de suero son muy sensibles al calor, los tratamientos térmicos intensos producen su total desnaturalización, por lo que, sólo se determinaron en los tratamientos de 70°C. Durante estos tratamientos la formación de lactulosa es muy baja (<5mg/100mL) y no se forma epilactosa, ni tampoco furosina, por ello estos indicadores sólo se determinaron en los tratamientos térmicos más intensos.

3.1.4.1. Desnaturalización de las proteínas de suero

La figura 23 muestra dos cromatogramas de las proteínas de suero mayoritarias, correspondientes a leche calentada 70°C durante 30 minutos mediante microondas y convencionalmente. Como se puede apreciar desde un punto de vista cualitativo, los dos cromatogramas presentan un aspecto similar, observándose en ambos casos la presencia de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA.

La figura 24 muestra el contenido en α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA de la leche cruda y calentada a 70°C 10, 20 y 30 minutos, tanto para el calentamiento con microondas como para el convencional. En ambos tipos de tratamiento, a medida que aumenta el tiempo de calentamiento se produce una mayor desnaturalización de las proteínas de suero. Como puede apreciarse, el contenido en las proteínas sin

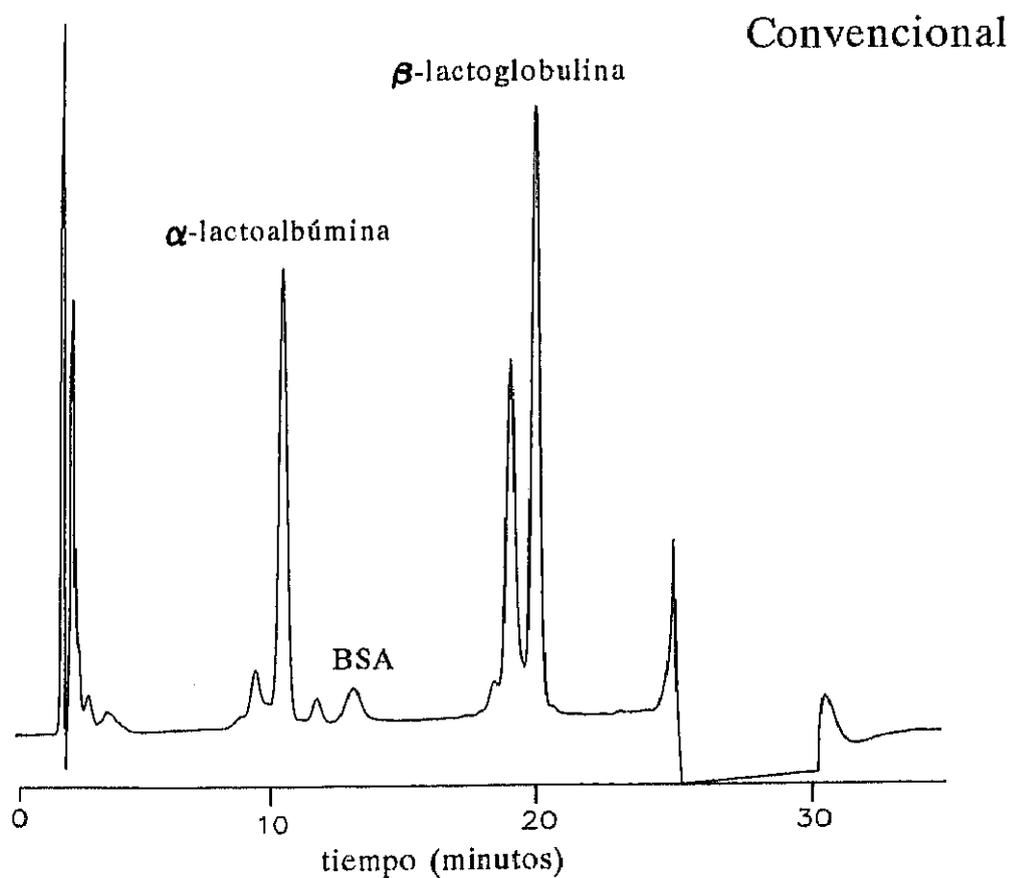
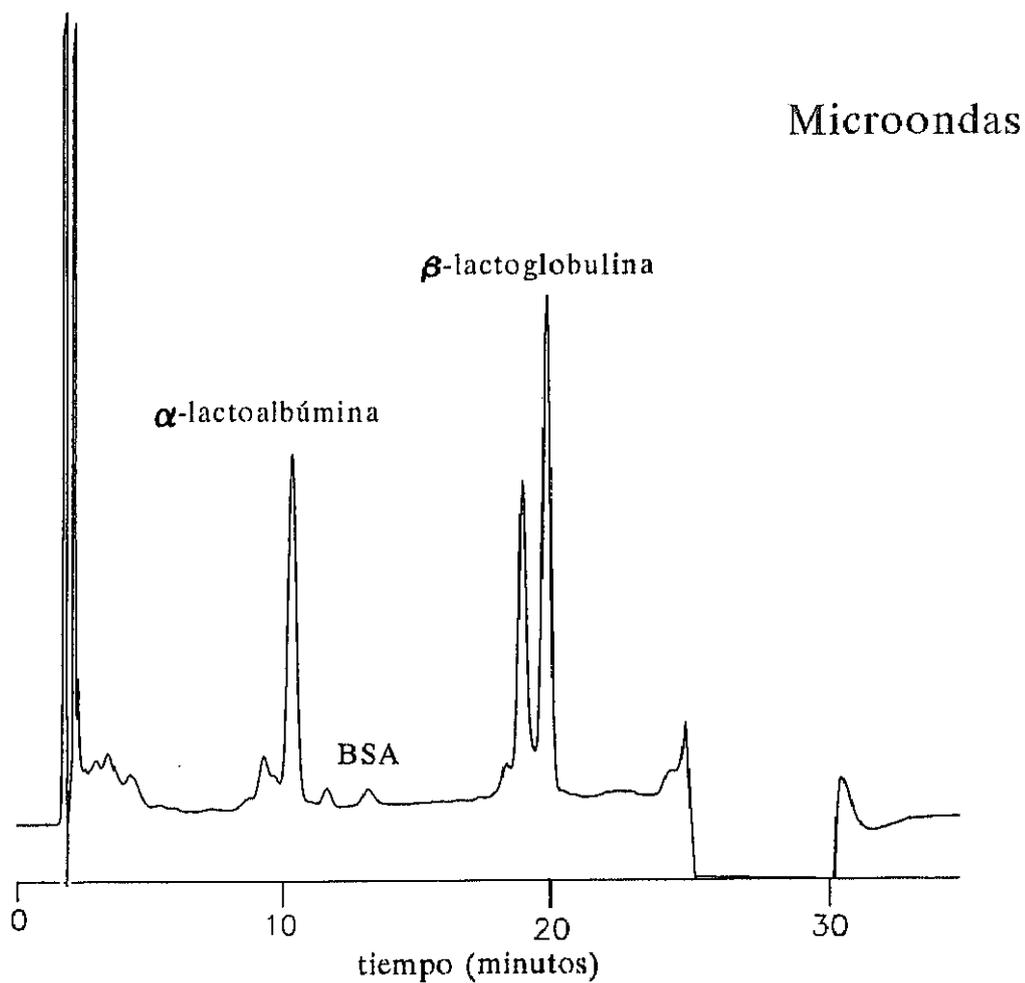


Figura 23. Cromatogramas correspondientes a las proteínas de suero mayoritarias de leches calentadas a 70°C durante 30 minutos mediante microondas y convencionalmente.

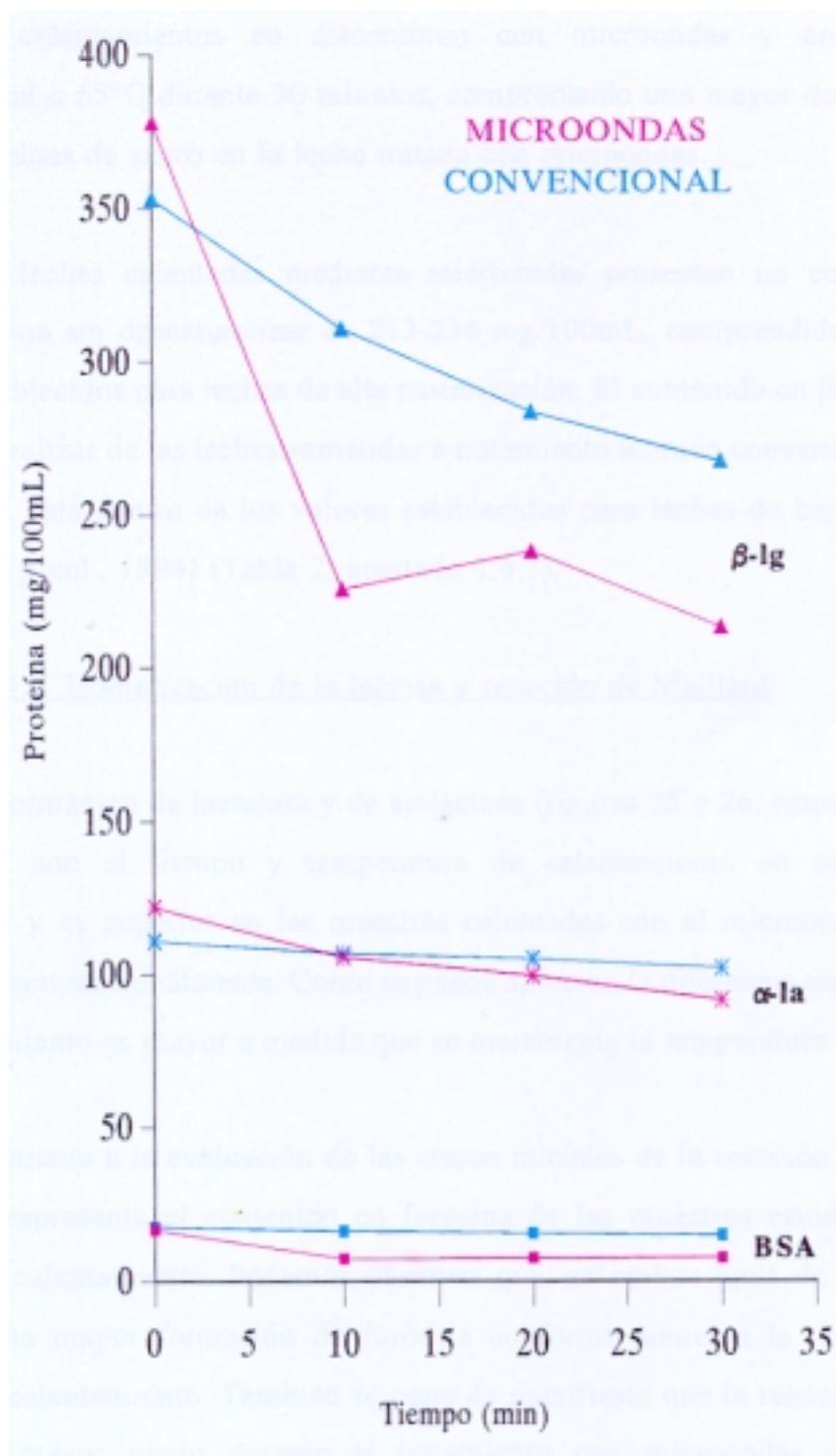


Figura 24. Contenido en proteínas de suero no desnaturalizadas (mg/100mL) de la leche calentada a 70°C durante 10, 20 y 30 minutos con microondas y convencionalmente.

desnaturalizar es inferior cuando se utiliza el microondas como sistema de calentamiento. Resultados similares obtuvieron Merin y Rosenthal (1984) cuando realizaron calentamientos en discontinuo con microondas y con un sistema convencional a 65°C durante 30 minutos, comprobando una mayor desnaturalización de las proteínas de suero en la leche tratada con microondas.

Las leches calentadas mediante microondas presentan un contenido en β -lactoglobulina sin desnaturalizar de 213-238 mg/100mL, comprendido dentro de los límites establecidos para leches de alta pasteurización. El contenido en β -lactoglobulina sin desnaturalizar de las leches sometidas a tratamiento térmico convencional, 267-310 mg/100mL, está dentro de los valores establecidos para leches de baja pasteurización (Buchheim y col., 1994) (Tabla 2, apartado 1.4.7).

3.1.4.2. Isomerización de la lactosa y reacción de Maillard

La formación de lactulosa y de epilactosa (figuras 25 y 26, respectivamente) se incrementa con el tiempo y temperatura de calentamiento en ambos tipos de tratamiento y es superior en las muestras calentadas con el microondas que en las calentadas convencionalmente. Como se puede apreciar, la diferencia entre ambos tipos de calentamiento es mayor a medida que se incrementa la temperatura de tratamiento.

En cuanto a la evaluación de las etapas iniciales de la reacción de Maillard, la figura 27 representa el contenido en furosina de las muestras estudiadas frente al tiempo de calentamiento. Podemos observar que, en ambos tipos de tratamiento, se produce una mayor formación de furosina conforme aumenta la temperatura y el tiempo de calentamiento. También se pone de manifiesto que la reacción de Maillard se da en mayor grado durante el tratamiento con microondas que durante el convencional.

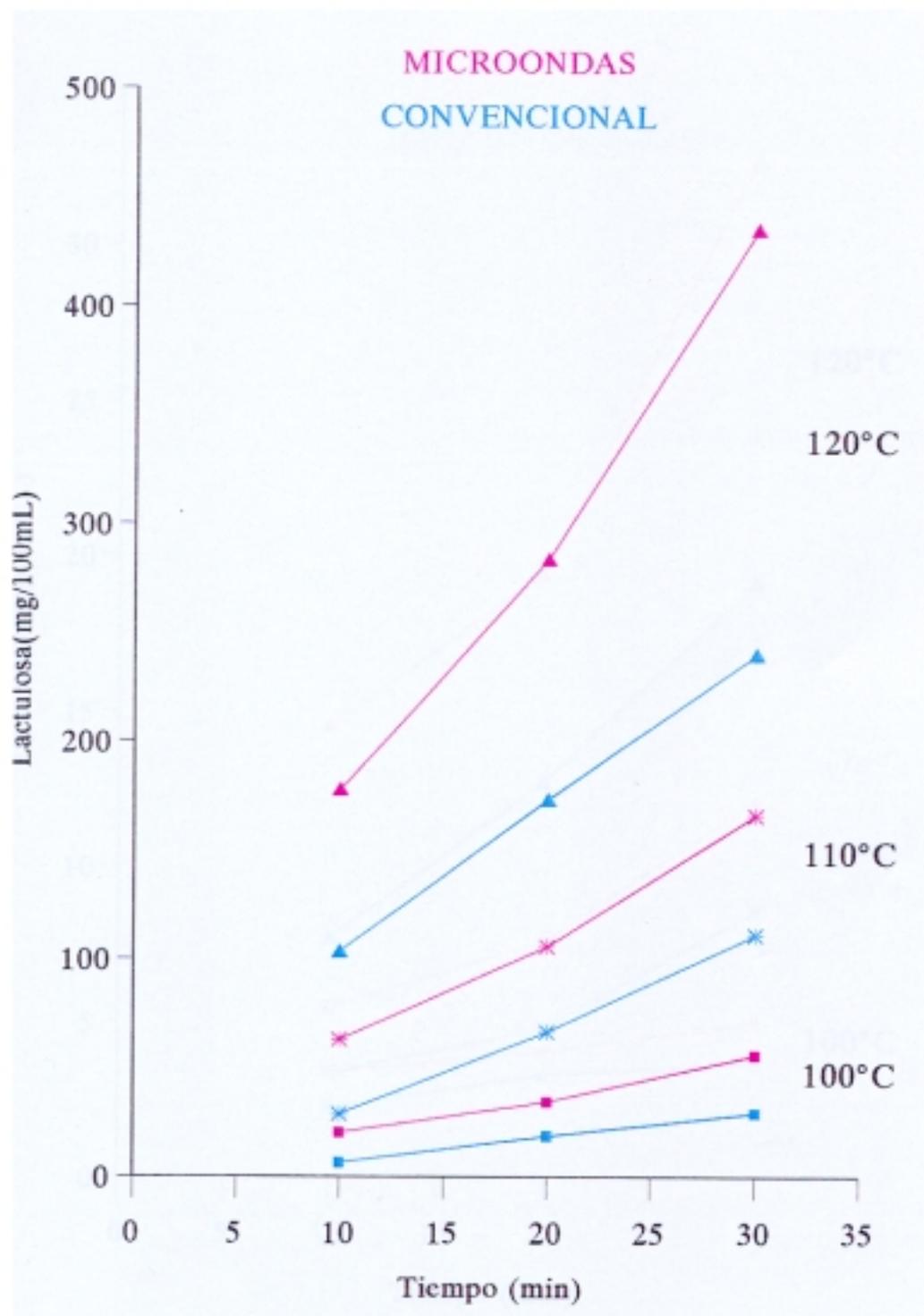


Figura 25. Contenido en lactulosa (mg/100mL) de la leche calentada a 100, 110 y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos con microondas y convencionalmente.

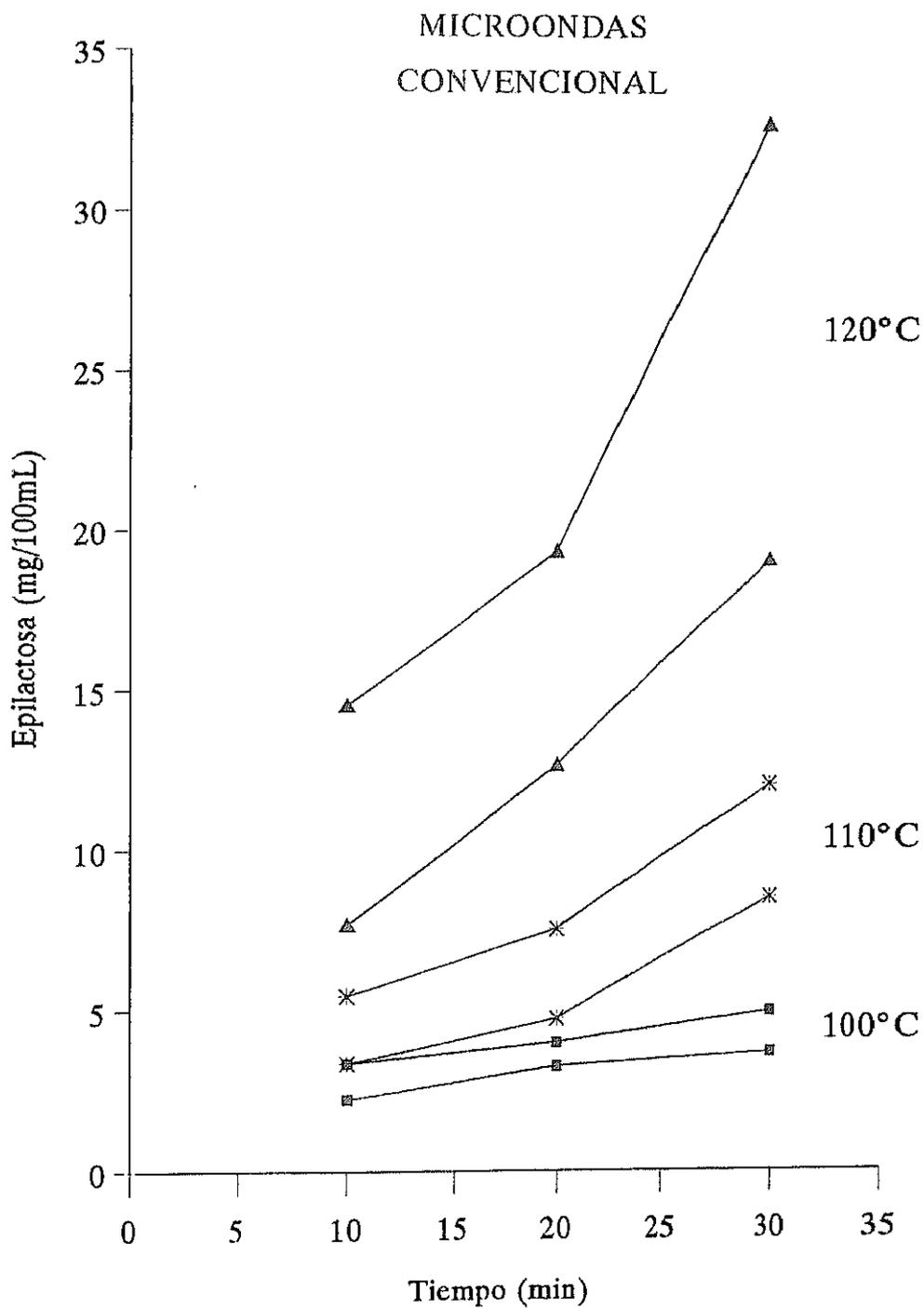


Figura 26. Contenido en epilactosa (mg/100mL) de la leche calentada a 100, 110 y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos con microondas y convencionalmente.

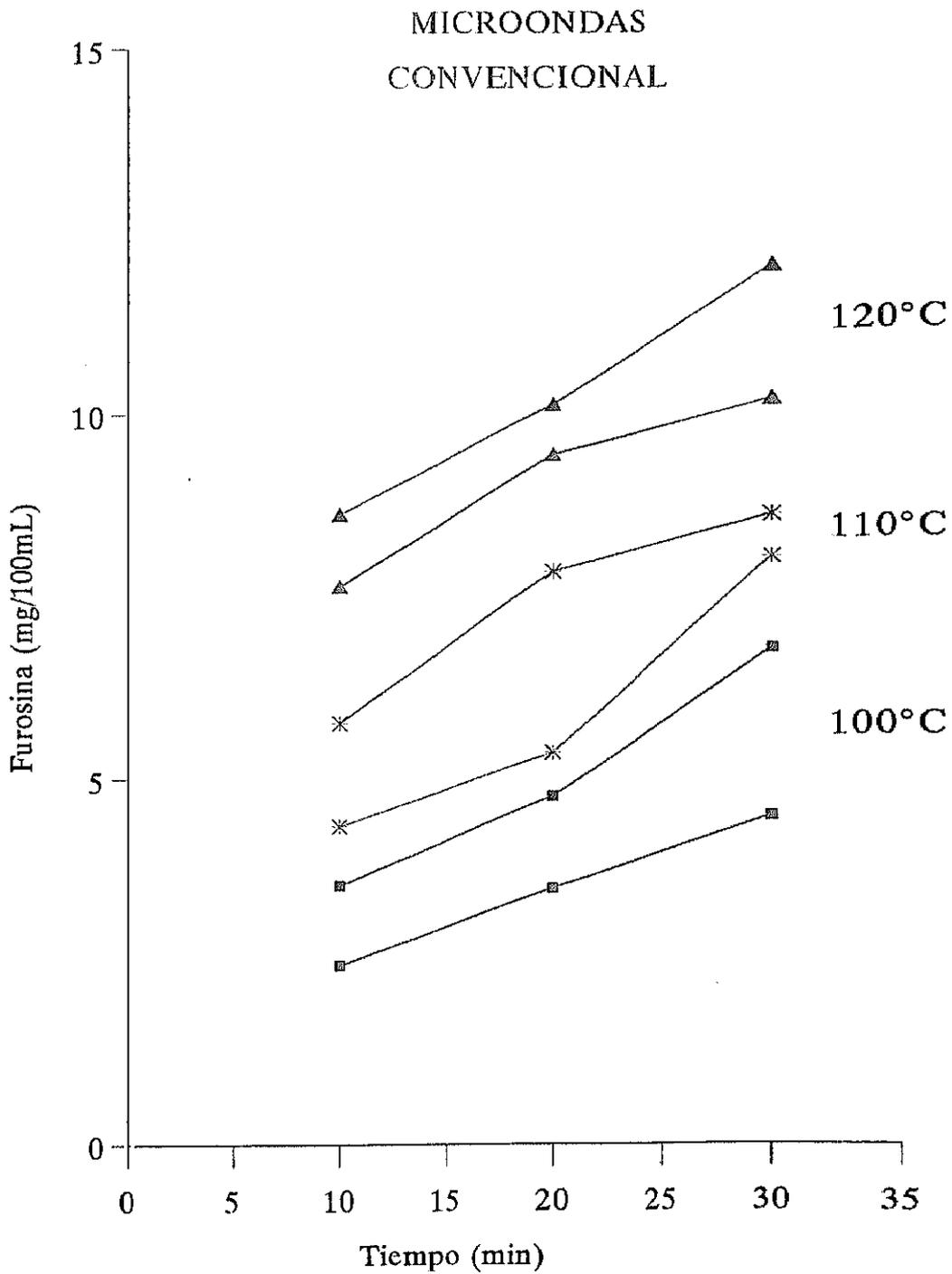


Figura 27. Contenido en furosina (mg/100mL) de la leche calentada a 100, 110 y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos con microondas y convencionalmente.

Los valores de lactulosa y furosina hallados en las muestras calentadas con microondas a 110°C durante 20 y 30 minutos, y a 120°C durante 10 minutos, así como en las procesadas convencionalmente a 110°C durante 30 minutos y 120°C durante 10 y 20 minutos, son similares a los encontrados por Martínez-Castro y Olano (1978) para la lactulosa y por Erbersdobler y col. (1987) para la furosina, en leches comerciales esterilizadas en botella.

Con respecto a la relación lactulosa/furosina la tabla 16 refleja los resultados correspondientes a ambos tipos de tratamiento. En general, se observa que los valores hallados son superiores en el caso de los calentamientos llevados a cabo con microondas. Esto se debe a que la relación lactulosa/furosina va aumentando con el tiempo de calentamiento y dado que en el tratamiento con microondas las reacciones de los componentes se encuentran aceleradas, el valor de dicha relación es mayor para un mismo tiempo.

3.1.4.3. Comparación de la precisión de los calentamientos con microondas y convencionales

En la tabla 17 se comparan los valores medios de DSR correspondientes a la formación de lactulosa y furosina y a la desnaturalización de las proteínas de suero en la leche calentada con microondas y convencionalmente y se puede observar que existe una mayor variabilidad en el primero de los casos. En 1980, Hayward y Kropf, también comprobaron que los valores de DSR eran superiores cuando se utilizaba un horno microondas en lugar de uno convencional para la eliminación de agua en leche. Posteriormente, Fernández-Márquez y col. (1992), realizaron la determinación del extracto seco en leche utilizando un horno microondas y uno convencional, y estudiaron la formación de HMF durante ambos tratamientos. Estos autores pusieron de manifiesto que los valores de DSR eran superiores en el caso de los tratamientos con microondas, tanto para la determinación del extracto seco como para la formación de HMF.

Tabla 16. Relación lactulosa/furosina (lu/fu) de leche calentada a 100, 110 y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos por microondas y convencionalmente.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Relación lu/fu</i>	
		<i>Microondas</i>	<i>Convencional</i>
100	10	5,72	3,02
	20	8,41	6,26
	30	9,47	7,45
110	10	11,82	8,99
	20	13,42	14,70
	30	16,15	15,39
120	10	20,44	16,79
	20	29,67	22,14
	30	34,15	28,30

Tabla 17. Valores medios de DSR (%) obtenidos para la formación de lactulosa, furosina y desnaturalización de proteínas de suero durante los tratamientos térmicos de la leche llevados a cabo de modo convencional (n=18) y con microondas (n=36).

<i>Tratamiento</i>	<i>Lactulosa</i>	<i>Furosina</i>	<i>Proteínas de suero</i>
Convencional	8,7	3,0	2,7
Microondas	22,3	10,0	28,6

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede deducir que la leche calentada con microondas sufre reacciones de isomerización de la lactosa, reacción de Maillard y desnaturalización de las proteínas de suero, observadas también en la leche calentada mediante tratamientos convencionales. Sin embargo, estas reacciones se producen en mayor grado en el tratamiento con microondas. Esto puede ser atribuido a la falta de uniformidad de la distribución de la temperatura durante este tipo de tratamiento, lo cual hace que existan ciertos "puntos calientes" donde se produce un efecto extra de aceleración de las reacciones.

Datta y Liu (1992), estudiando perfiles de temperatura-tiempo en tratamientos térmicos con microondas y convencionales concluyeron que, en condiciones comparables, el primer tipo de calentamiento puede producir mayor degradación térmica que el segundo, debido principalmente a factores relacionados con el tipo de alimento y diseño del equipo. Sin embargo, cuando un tratamiento con microondas ocasiona menor degradación térmica que uno convencional, se debe al rápido y uniforme calentamiento de las microondas sobre el alimento, y esto sólo ocurre en determinadas circunstancias.

3.2. TRATAMIENTOS EN FLUJO CONTINUO

3.2.1. Puesta a punto del equipo microondas

Con objeto de estudiar la influencia de la posición del tubo de teflón en el interior de la cavidad del horno microondas sobre el calentamiento de la leche, se llevaron a cabo tratamientos térmicos situando dicho tubo bien en la parte superior izquierda de la cavidad, bien en un soporte de PVC, apoyado en la base del microondas.

En ambos casos, durante el período inicial del calentamiento, parte de la energía incidente se destinaba a calentar el sistema, por lo que la recogida de las muestras se realizó entre los minutos 6 y 10. En la figura 28 se muestra, a modo de ejemplo, la evolución de la temperatura frente al tiempo al calentar leche entera en un tubo de teflón de 2 m situado sin soporte en la parte superior de la cavidad, utilizando 5 flujos distintos. Como puede observarse, existe una rampa de calentamiento de 3 minutos aproximadamente, hasta llegar a la temperatura de equilibrio. En nuestro caso, la toma de muestra se realizó a partir del minuto 6 para garantizar que se había alcanzado el equilibrio.

En todas las condiciones estudiadas el flujo fue laminar (Simpson y Williams, 1974).

Se realizaron por duplicado calentamientos de leche UHT entera y desnatada en tubo de teflón de 2 m situado en la parte superior izquierda de la cavidad y en el soporte de PVC apoyado en la base del microondas. Los resultados correspondientes se muestran en las tablas 18 y 19, respectivamente. En ambos casos se observa que, conforme disminuye el flujo incrementa la temperatura de la leche y viceversa, ya que cuando los flujos son bajos el tiempo de residencia de la leche en el interior del tubo sometido a las microondas es mayor y se produce, por tanto, un mayor calentamiento.

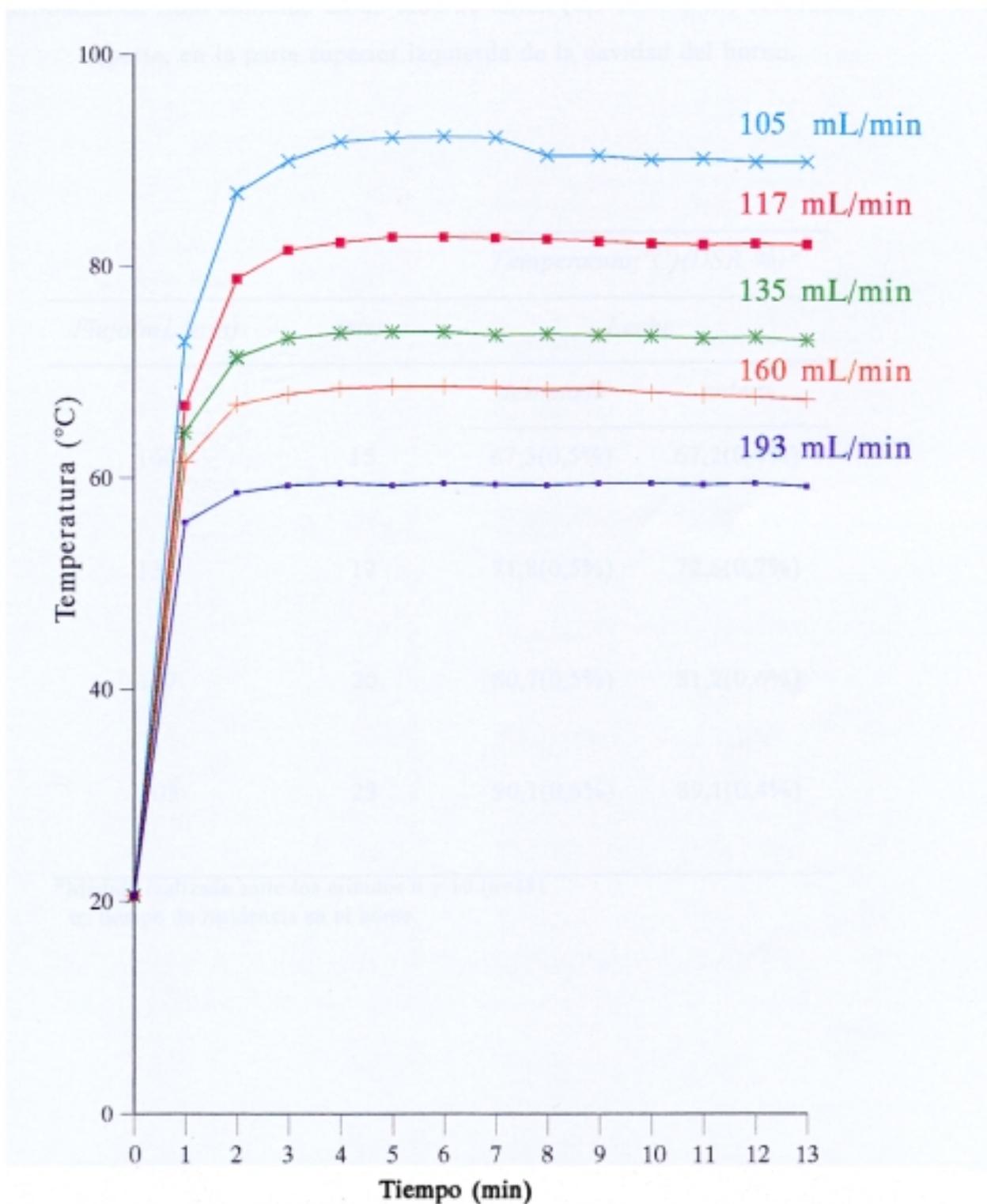


Figura 28. Perfil de calentamiento de leche entera mediante microondas en tubo de teflón (2 m), sin soporte, a flujos comprendidos entre 105 y 193 mL/min.

Tabla 18. Condiciones de procesado de leche entera y desnatada calentada con microondas en flujo continuo en un tubo de teflón (0,5 cm x 2 m) colocado, sin soporte, en la parte superior izquierda de la cavidad del horno.

<i>Flujo(mL/min)</i>	<i>tr(s)</i>	<i>Temperatura(°C)(DSR %)*</i>	
		<i>Leche</i>	
		<i>desnatada</i>	<i>entera</i>
160	15	67,3(0,5%)	67,2(0,4%)
135	17	71,8(0,5%)	72,6(0,7%)
117	20	80,7(0,5%)	81,2(0,6%)
105	23	90,1(0,5%)	89,1(0,4%)

*Medida realizada entre los minutos 6 y 10 (n=18).

tr: tiempo de residencia en el horno.

Tabla 20. Condiciones de procesado de leche entera calentada con microondas en flujo continuo en un tubo de teflón (0,5 cm x 1,25 m) colocado en el soporte de PVC, apoyado en la base del horno microondas.

<i>Flujo(mL/min)</i>	<i>tr(s)</i>	<i>Temperatura(°C)</i> <i>(DSR %)*</i>
		<i>Leche entera</i>
135	11	72,2(0,4%)
117	13	78,5(0,3%)
105	14	89,0(0,4%)
95	16	95,0(0,7%)

*Medida realizada entre los minutos 6 y 10 (n=18).
tr: tiempo de residencia en el horno.

IV. CONCLUSIONES

V. BIBLIOGRAFIA

- Sadoun, D., C. Couvercelle, A. Strasser, A. Egler y C. Hasselmann. (1991). Low dose irradiation of liquid milk. *Milchwiss.*, **46**, 295.
- Sakai, N., A. Fujii y T. Hanzawa. (1993). Heat transfer analysis in a food heated by far-infrared irradiation. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.*, **40**, 469.
- Sale, A.J.H. (1976). A review of microwaves for food processing. *J. Food Technol.*, **11**, 319.
- Sastry, S.K. (1992). A model for heating of liquid-particle mixtures in a continuous flow ohmic heater. *J. Food Process Eng.*, **15**, 263.
- Scherba, G., R.M. Weigel y W.D.O'Brien, Jr. (1991). Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2079.
- Schiffmann, R.F. (1986). Food product development for microwave processing. *Food Technol.*, **40**, 94.
- Schlegel, W. (1992). Commercial pasteurization and sterilization of food products using microwave technology. *Food Technol.*, **46**, 62.
- Schleicher, E. y O.H. Wieland. (1981). Specific quantification by HPLC of protein (lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 81.
- Schmidt, D., S.J. Cromie y T.W. Dommett. (1989). Effect of pasteurization and storage conditions on the shelf life and sensory quality of aseptically packaged milk. *Austr. J. Dairy Technol.*, **44**, 19.
- Segal, W. (1990). Microwave heating of milk. *Lancet*, **335**, 470.

- Sharaf, M.A., D.L. Illman y B.R. Kowalski. (1986). In Chemometrics. Ed John Wiley and Sons, New York.
- Shibauchi, Y., H. Yamamoto y Y. Sagara. (1992). Conformational change of casein micelles by high pressure treatment. First European meeting.
- Shindler, J.S., R.E. Childs y W.G. Bardsley. (1976). Peroxidase from human cervical mucus. The isolation and characterization. *European J. Biochem.*, **65**, 325.
- Sieber, R., W. Eberhard y P. Strahm. (1993). Mikrowellenerhitzung von milch: zonale unterschiede und einfluß des rührens. *Ernährung/Nutrition*, **17**, 83.
- Simpson, S.G. y M.C. Williams. (1974). An analysis of High Temperature/Short Time Sterilization during laminar flow. *J. Food Sci.*, **39**, 1047.
- Skudder, P.J. (1988). Ohmic heating: new alternative for aseptic processing of viscous foods. *Food Eng.*, **60**, 99.
- Skudder, P.J. (1989). Fortschritte in der kontinuierlichen aseptischen Herstellung von lebensmitteln mit dem ohmic heating-verfahren. *DMZ Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, **110**, 200.
- Sochanski, J.S., J. Goyette y T.K. Bose. (1990). Freeze dehydration of foamed milk by microwaves. *Drying Technol.*, **8**, 1017.
- Starck, E. (1989). Electromagnetic radiation and ultrasonics : what are their applications in dairying?. *Rev. Lait. Fr.*, **487**, 46.
- Statgraphics Version 5 Reference Manual. 1991. STSC, Inc, Rockville, MD.

- Stearns, G. y P.C. Vasavada. (1986). Effect of microwave processing on quality of milk. *J. Food Prot.*, **49**, 853.
- Stepaniak, L. (1991). Factors affecting quality and possibilities of predicting shelf life of pasteurized and ultra-high temperature heated milks. *Ital. J. Food Sci.*, **1**, 11.
- Stucki, F. (1951). Zur Frage der Ultraviolett-Bestrahlung der Milch mit besonderer Berücksichtigung der Wirkung des Stoutz-Actinator auf deren Keimgehalt. Diss. Uni. Bern.
- Suhren, G. (1990). Zur bakteriologischen Beschaffenheit von wärmebehandelter konsummilch. Eine Untersuchung von Handelsproben aus 10 europäischen Ländern. *Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, **15**, 468.
- Svenson, G. (1987). Microwave systems save time and energy. *Prepared Foods*, **156**, 86.
- Taborsak, N. y V. Basic. (1984). Possibilities of using microwave in milk processing. *Mljekarstvo*, **34**, 82.
- Thompson, J.S. y A. Thompson. (1990). In-home pasteurization of raw goat's milk by microwave treatment. *J. Food Microbiol.*, **10**, 59.
- Tomarelli, R.M., R.J. Yuhas, A. Fisher y J.R. Weaver. (1985). An HPLC method for the determination of reactive (available) lysine in milk and infant formulas. *J. Agr. Food Chem.*, **33**, 316.
- Veisseyre, R. (1980). Lactología Técnica. (Libro). Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Versión española de J.V. Barroso. Ed. Acribia, Zaragoza.

- Vela, G.R, y J.F. Wu. (1979). Mechanism of lethal action of 2450 MHz radiation on microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 550.
- Verhaar, L.A., M.J.M. van der Aaist, J.A.W.N. Beenackers y B.F.M. Kuster. (1979). Ion-exchange chromatography of lactose-lactulose isomerization mixtures using a boric acid-borate eluent. *J. Chromatogr.*, **170**, 363.
- Vidal-Valverde C. y P. Redondo. (1993). Effect of microwave heating on the tiamin content of cow's milk. *J. Dairy Res.*, **60**, 259.
- West, F.P., D.M. Adams, M.L. Speck. (1978). Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra-high temperature sterilized milk by a low temperature treatment. *J. Dairy Sci.*, **61**, 1078.
- Williams, D.J. (1986). A modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat's milk. *Austr. J. Dairy Technol.*, **41**, 28.
- Winter, A., K. Ek y V. Anderson. (1977). Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. *Application Note 250 LKB*.
- Woerner, F. (1961). Recent views on the peroxidase activity in milk. *Kiel Michwirt. Forschungsber*, **13**, 361.
- Wrigley, D.M. y N.G. Llorca. (1992). Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. *J. Food Prot.*, **55**, 678.
- Yousef, A.E. y E. H. Marth. (1986). Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M₁ in raw or heated milk with and without added peroxide. *J. Dairy Sci.*, **69**, 2243.
- Zall, R.R., J.H. Chen y S.C. Murphy. (1982). Estimating the number of psychrotrophs in milk using the direct microscopic method. *Cult. Dairy Prod. J.*, **17**, 24.